U N I V E R S I T E R E N E D E S C A R T E S

D E P A R I S

-=-=-=-=-=-=-=-=-

UNITE d'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1972-1973

Série U N° 506

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES
DE PARIS

Pour l'obtention du titre
de
Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Janine DESCROZAILLES-GOIGOUX

Assistant à l'Université René Descartes
Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie et Bactériologie

Titre de la thèse

Contribution à l'étude des gaz produits par des bactéries anaérobies des gangrènes gazeuses cultivées en milieux synthétiques

Soutenue le 27 Juin 1973

JURY : MM. J.BORY Président
M.CHAIGNEAU
A.DESVIGNES } Examinateurs
Mme J.HUBERT

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549212_0027

U N I V E R S I T E R E N E D E S C A R T E S

D E P A R I S

-=-=-=-=-=-=-=-

UNITE d'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

Année 1972-1973 Série U N° 506

T H E S E

présentée

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES
DE PARIS

Pour l'obtention du titre
de
Docteur de l'Université
(Mention Pharmacie)

par

Janine DESCROZAILLES-GOIGOUX

Assistant à l'Université René Descartes
Diplômée d'Etudes Spéciales de Sérologie et Bactériologie

Titre de la thèse

Contribution à l'étude des gaz produits par des bactéries anaérobies des gangrènes gazeuses cultivées en milieux synthétiques

Soutenue le 27 Juin 1973

JURY : MM. J.BORY Président
M.CHAIGNEAU
A.DESVIGNES Examinateurs
Mme J.HUBERT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de mon Père,

Monsieur Paul GOIGOUX

Pharmacien, ex-Interne des Hôpitaux de Paris

A ma Mère, à mon Mari, à mes Enfants,

Qu'ils soient assurés de toute ma tendresse et de mes remerciements pour l'affection et le soutien moral qu'ils n'ont cessé de me témoigner.

A ma Famille

A mes Amis

A Monsieur J.BORY

Professeur d'Immunologie à l'Université René Descartes,
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris.

Qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse dont il
a inspiré le sujet, après nous avoir
accueillie avec bienveillance dans
son laboratoire et nous avoir guidée
dans la réalisation de ce travail.

En témoignage de notre profonde gratitude
et de notre respectueuse reconnaissance
pour l'attention vigilante et les précieux
conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

A Monsieur M.CHAIGNEAU

Directeur du Service d'Analyse des Gaz et de
l'Equipe de Recherche nº42 du C.N.R.S.,
Membre de l'Académie de Pharmacie.

Qui a bien voulu participer avec une grande affabilité à l'élaboration de ce travail et nous a fait bénéficier de sa profonde compétence dans le domaine de l'analyse des gaz.

En témoignage de nos sincères remerciements et de notre vive gratitude.

A Monsieur A.DESVIGNES

Professeur de Microbiologie à l'Université René Descartes

En témoignage de nos sentiments très reconnaissants pour avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et accepter de faire partie de notre Jury.

A Madame J.HUBERT

Maître de Conférences Agrégé de Microbiologie
à l'Université René Descartes

Dont nous avons grandement apprécié la clarté
d'esprit lors de l'exposé de ses cours,
ainsi que sa bienveillante attention à
notre égard et ses conseils avisés.

En témoignage de notre sincère gratitude
et de nos très amicaux remerciements.

A Mademoiselle S.LAMBIN

Professeur de Microbiologie à l'Université Paris-Sud
Membre de l'Académie de Pharmacie
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a toujours manifesté des marques de grande bienveillance à l'égard de la nouvelle étudiante que nous étions, et nous a accueillie avec confiance dans son laboratoire.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueux attachement.

A Mademoiselle C.LABARRE

Maître de Conférences délégué à l'Université d'Angers

Qui nous a gentiment fait bénéficier de son expérience et nous a initiée à la compréhension et à la réalisation de certaines techniques analytiques.

Qu'elle soit assurée de nos vifs remerciements et de notre amitié.

A Mademoiselle M.CHASTAGNIER

Docteur ès-Sciences Physiques au Service d'Analyse des Gaz du C.N.R.S.

Dont la compétence et les conseils éclairés nous ont grandement aidée.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

A Monsieur L.GIRY

Ingénieur physicien au Service d'Analyse des Gaz du C.N.R.S.

Qui a directement contribué à l'accomplissement de ce travail dans le domaine de la spectrométrie de masse.

Avec nos sincères remerciements pour son aide.

Au personnel du Service d'Analyse des Gaz du C.N.R.S.

Avec toute notre sympathie.

A Madame M.ROBERT

Docteur en Pharmacie

Maître-Assistant au C.E.S. d'Immunologie de l'Université René Descartes

Avec laquelle il ést si agréable de travailler et dont les encouragements et l'aide morale qu'elle nous a apportés nous ont toujours été si précieux.

Qu'elle soit assurée de notre profonde et chaleureuse gratitude.

Aux Enseignants des Travaux Pratiques des C.E.S. de Bactériologie-Immunologie de l'Université René Descartes

Qu'ils reçoivent nos sincères remerciements pour l'atmosphère de confiante sympathie dans laquelle nous travaillons.

A mes Collègues Assistants

Qu'ils trouvent ici l'expression de la sincère amitié que nous éprouvons pour chacun d'eux.

Aux Techniciennes du C.E.S. de Bactériologie-Immunologie de l'Université René Descartes

en particulier Mesdemoiselles F.COLAS et M.LEMEUNIER

Un grand merci pour l'aide qu'elles nous ont accordée toujours avec le sourire.

Au personnel de ce laboratoire

Avec ma vive sympathie.

I N T R O D U C T I O N

Plusieurs auteurs ont déjà analysé la composition du dégagement gazeux produit par certains germes anaérobies en les cultivant dans différents milieux : lait, eau peptonée, bouillon peptoné, milieu au thioglycolate de sodium, etc. D'autres chercheurs se sont orientés vers l'étude de la culture de ces germes dans des milieux strictement synthétiques.

Nous avons tenté d'établir la composition des mélanges gazeux produits par différents germes anaérobies à partir de milieux synthétiques dont nous avons fait varier certains éléments, à savoir des acides aminés, ceci afin d'établir une éventuelle corrélation entre la qualité et la quantité des gaz et les acides entrant dans la composition de chaque milieu correspondant.

Nous avons utilisé la technique classique de l'analyse sur la cuve à mercure dont nous avons vérifié et complété les résultats par la spectrométrie de masse.

Les indications rapportées dans les différents chapitres sont les suivantes :

Chapitre I : Nous parcourerons rapidement l'historique concernant l'étude des gaz dégagés par les bactéries anaérobies.

Chapitre II : Il sera consacré à la préparation et à la composition des milieux de culture que nous avons utilisés.

Chapitre III : Un protocole expérimental sera expliqué, détaillant les techniques employées.

Chapitre IV : Il comprendra l'exposé des travaux antérieurs concernant chaque germe étudié, ainsi que les résultats que nous avons obtenus.

Chapitre V : Il concernera la discussion des résultats.

Chapitre VI : Nous y exposerons la conclusion globale de nos travaux.

-=-

C H A P I T R E I

H I S T O R I Q U E

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la production de gaz par les anaérobies. Avant même que PASTEUR (64) eut établi le principe de la vie sans oxygène, au cours d'une séance à l'Académie des Sciences en 1861, RENAULT (83) dès 1840 signale une gangrène traumatique des animaux domestiques, puis CHASSAIGNAC (28) et MAISONNEUVE (56) en 1853 décrivent des empoisonnements putrides. En 1877, PASTEUR (66,65) découvrit le vibrion septique, reconnu en 1884 par CHAUVEAU et ARLOING (29) comme agent de la gangrène gazeuse.

Le bacille perfringens fut ensuite trouvé par WICKLEIN (113) et FRAENKEL (36) comme pouvant également provoquer des gangrènes gazeuses. Isolé par WELCH et NUTTAL (112) en 1892, il fut étudié en 1898 par VEILLON et ZUBER (103).

Puis, pendant la guerre de 1914-1918, WEINBERG et SEGUIN (107,108,109,110,111) d'une part, REGNIER (82) d'autre part, identifièrent et étudièrent de nombreux

microbes anaérobies, suivis par d'autres auteurs, en particulier SORDELLI (95), et il fut reconnu que la gangrène gazeuse pouvait être due à une association soit de bacilles uniquement anaérobies, producteurs de gaz (MURAZ,61), soit de bacilles anaérobies et de bacilles aérobies.

La classification française fut établie par PREVOT et son école qui firent de nombreuses études au sujet des espèces anaérobies.

C'est à partir de la guerre de 1914-1918 que commencèrent les nombreux travaux effectués sur les anaérobies et en particulier ceux de WOLF et HARRIS (118,121,119,120,115, 116,42,117)dès 1917 concernant la biochimie et le métabolisme de ces germes, à partir de différents milieux de culture comme le lait et l'eau peptonée. Ils établirent la courbe de dégagement gazeux en fonction du temps, ainsi que celle des variations du pH. Ils étudièrent ainsi cinq germes : Welchia perfringens, Clostridium sporogenes, Clostridium histolyticum, Clostridium septicum et Clostridium oedematiens, et nous reportons au chapitre de chacun de ces germes, leurs résultats concernant l'analyse des gaz totaux et les concentrations relatives de gaz carbonique et d'hydrogène.

Ces deux composés furent également reconnus dans la production gazeuse d'autres bacilles, étudiés par KENDALL, DAY et WALKER (45), BROWN (22,23), Mc CLUNG et Mc COY (57), de même que par WEINBERG, NATIVELLE et PREVOT (106), PREVOT TURPIN et KAYSER (80) et par PREVOT dans d'autres publications. (70,72,73,74,75).

Des études furent également suivies au sujet de la production de gaz soufrés, en particulier de l'hydrogène sulfuré déjà découvert en 1895 par BEIJERINCK (2,3,4,5) à partir de

la culture de Spirillum desulfuricans. Citons les travaux de MYERS (62) et THOMPSON (97) en 1920, de TILLEY (98,99) en 1923. KAHN (44) en 1925 cultiva de nombreuses bactéries anaérobies sporulées dans des milieux contenant ou non du thiosulfate. Le noircissement d'acétate de plomb, utilisé comme réactif, prouvait le dégagement de l'hydrogène sulfuré provenant du thiosulfate pour Clostridium histolyticum, certains germes pouvant produire ce gaz en l'absence de thiosulfate.

On sait que l'hydrogène sulfuré confère une odeur désagréable aux cultures d'anaérobies, odeur signalée dès 1877 par PASTEUR et JOUBERT (66) mais il n'est pas le seul produit soufré à incriminer et le méthanol-thiol fut trouvé comme étant produit par le Bacillus liquefaciens magnus en 1889 par SELITRENNY (90), suivi par NENCKI et SIEBER (63) et SALUS (88). RUBNER (84) signala la présence de méthyl-mercaptan et DUCLAUX (32) celle de méthyl et d'éthyl mercaptans.

D'après GUGGENHEIM (41) en 1933, les anaérobies dégagent à partir de leurs cultures toute une série de produits malodorants : hydrogène sulfuré, scatole, indole, mercaptans, thioesters, amines de décarboxylation.

Les élèves de PREVOT (78,13,37,49,11,68,12,79) publièrent de nombreux travaux au sujet de la production d'amines par les germes anaérobies, mais le pH généralement acide en fin de culture s'oppose à la volatilisation de ces produits, qu'on ne peut retrouver dans les gaz.

Signalons également l'acroléine décelée dans le substrat par FRIEDMANN et KMIECIAK (38).

La production de méthane par Welchia perfringens dans certaines conditions fut rapportée par LAIGRET (52) en 1945, mais ne fut pas retrouvée par PREVOT et ses élèves (71,77,76).

La mise au point d'un appareillage et d'une technique d'extraction des gaz a permis en 1965 à CHAIGNEAU, BORY, LE MOAN et LABARRE d'aborder d'une façon nouvelle la composition des gaz dégagés par les bactéries anaérobies telluriques, agents des gangrènes gazeuses (27-51-54). LABARRE, dans sa thèse en 1968, étudia pour chaque germe cultivé en milieu au thioglycolate la courbe de l'évolution du dégagement gazeux en fonction du temps, le volume total et la composition centésimale de ce dégagement gazeux, l'analyse d'échantillons gazeux prélevés à différents stades, ainsi que la valeur du pH et le taux du glucose en fin de culture.

On y retrouve, comme dans l'ensemble des travaux jusque là effectués, de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène constituant la plus grande partie des gaz. La plupart des germes donnent lieu à une production d'hydrogène sulfuré; d'autres composés soufrés, tels que le méthane-thiol CH_3-SH et le disulfure de diméthyle CH_3-S-S-CH_3 furent décelés.

BENICHOU (6) étudia les mêmes germes, mais analysa les gaz dégagés après alcalinisation du milieu en fin de culture; il utilisa, entre autres, la chromatographie en phase gazeuse pour déceler différents composés. Cette méthode a permis de trouver un certain nombre de composés, notamment des amines et des alcools.

C H A P I T R E I I

MILIEUX DE CULTURE

Nous utilisons des milieux uniquement synthétiques lesquels, comme tout milieu de ce genre pour bactéries hétérotrophes (LAMBIN et GERMAN, 53), doivent comprendre :

- de l'eau
- des sels minéraux
- du glucose fournissant de l'énergie et une partie du carbone organique
- des acides aminés fournissant du carbone et de l'azote assimilables
- des facteurs de croissance représentés ici par des vitamines.

C'est le milieu synthétique NCAS-I employé pour la germination et la croissance de Clostridium botulinum 62 A de PERKINS et TSUJI (67) qui nous a servi de formule de base à partir de laquelle nous avons établi la composition des différents milieux (Tableau I).

TABLEAU I

Composition du milieu synthétique de PERKINS et TSUJI

	Poids pour 100cm^3 de milieu			Poids pour 100cm^3 de milieu	
Alanine	0,04	g	$FeSO_4$ 7 H_2O	0,2	mg
Arginine	0,2331	g	$CaCl_2$ 2 H_2O	0,2	mg
Cystéine	0,0847	g	$MnSO_4$ H_2O	1	mg
Acide glutamique	0,0102	g	$MgSO_4$ 3 H_2O	4	mg
Glycine	0,012	g	NaCl	0,2	mg
Histidine	0,0201	g	K_2HPO_4	100	mg
Isoleucine	0,0497	g	KH_2PO_4	100	mg
Leucine	0,156	g			
Lysine	0,1197	g			
Méthionine	0,0596	g			
Phénylalanine	0,099	g	Eau distillée	100cm^3	
Proline	0,0494	g			
Sérine	0,0997	g			
Thréonine	0,0999	g			
Tryptophane	0,0047	g			
Tyrosine	0,0253	g			
Valine	0,1989	g			
Biotine	0,05	µg			
Thiamine	40	µg			
Ac.para-amino benzoïque	1	µg			
Glucose	0,5	g			

Les premiers essais effectués ne nous ayant pas donné entière satisfaction quant à l'abondance de la culture des germes, nous avons doublé la concentration des acides aminés et des vitamines. De plus, nous avons ajouté deux autres vitamines, à savoir la pyridoxine et le pantothénate de calcium.

Pour faciliter la préparation des milieux, nous avons effectué des solutions des différents composants, solutions dont nous prélevons des quantités déterminées pour chaque milieu. Faisant varier seulement les acides aminés, nous avons préparé séparément des solutions de chacun de ces produits, tandis que sels et vitamines étant toujours utilisés dans les mêmes proportions, nous avons préparé une solution globale de tous les sels et une de toutes les vitamines.

Nous allons étudier successivement les différents composants, leur mise en solution et leur mélange.

ACIDE AMINES

Voici la liste des différents acides aminés utilisés sous leur forme lévogyre (Tableau II).

Pour chacun d'entre eux, nous avons pesé la quantité nécessaire à dissoudre ultérieurement dans 20cm^3 de façon que 2cm^3 de cette solution représente la quantité voulue pour 100cm^3 de milieu.

Le tableau III montre :

- dans la deuxième colonne : le poids de chaque acide aminé pour 100cm^3 de milieu final (poids doublé par rapport au tableau I).

TABLEAU II

Acides aminés

Monoacides		
Glycine	2	atomes de Carbone
Alanine	3	" "
Valine	5	" "
Leucine	6	" "
Isoleucine	6	" "
Diacides		
Acide aspartique	4	" "
Acide glutamique	5	" "
Diaminés		
Lysine	6	" "
Arginine	6	" "
Histidine	6	" "
Alcools		
Sérine	3	" "
Thréonine	4	" "
Soufrés		
Cystéine	3	" "
Méthionine	5	" "
Aromatiques		
Phénylalanine	9	" "
Tyrosine	9	" "
Tryptophane	11	" "
Iminé		
Proline	5	" "

TABLEAU III

Quantités utilisées d'acides aminés

Acides aminés	Poids pour 100 cm^3 de milieu	Quantité à peser
Alanine	0,08 g	0,8 g
Arginine chlorhydrate	0,564 g	5,64 g
Cystéine chlorhydrate	0,2205 g	2,205 g
Acide glutamique	0,0204 g	0,204 g
Glycine	0,024 g	0,24 g
Histidine	0,0402 g	0,402 g
Isoleucine	0,0994 g	0,994 g
Leucine	0,312 g	3,12 g
Lysine chlorhydrate	0,2994 g	2,994 g
Méthionine	0,1192 g	1,192 g
Phénylalanine	0,198 g	1,98 g
Proline	0,0988 g	0,988 g
Sérine	0,1994 g	1,994 g
Thréonine	0,1998 g	1,998 g
Tryptophane	0,0094 g	0,094 g
Tyrosine	0,0506 g	0,506 g
Valine	0,3978 g	3,978 g

- dans la troisième colonne : la quantité à peser et à solubiliser dans 20cm^3.

La question de la solubilité dans l'eau de chaque acide aminé s'est posée. Certains sont solubles, soit sous forme de base, soit sous forme de chlorhydrate.

N'ayant seulement pu nous procurer que trois acides aminés (arginine, cystéine, lysine) sous cette dernière forme, les autres ont été à dissoudre d'abord dans une quantité suffisante d'acide chlorhydrique N 1/10, l'eau étant ajoutée ultérieurement pour compléter à 20cm^3.

Nous avons été obligée de dissoudre la leucine et la valine uniquement dans de l'acide chlorhydrique, et en chauffant légèrement (Tableau IV).

Nous disposons donc de solutions des différents acides aminés dont nous prélèverons 2cm^3 (sauf pour la leucine : 2,5cm^3), pour préparer 100cm^3 de milieu. Ces solutions sont conservées en tubes bouchés au réfrigérateur à +4ºC; celle de cystéine est répartie à raison de 2cm^3 par tube, conservés au congélateur.

SELS

Nous préparons un litre de solution contenant les sept sels ; 10cm^3 représentent la quantité nécessaire de chacun pour 100cm^3 de milieu.

Les chiffres contenus dans la troisième colonne du tableau V représentent donc les quantités de chaque sel à peser.

Les deux phosphates sont à dissoudre en chauffant légèrement, le phosphate monopotassique dans 20cm^3 d'eau,

TABLEAU IV

Solubilité des acides aminés

Acides aminés	HCl N 1/10	Eau
Alanine		20 cm^3
Arginine chlorhydrate		20 "
Cystéine chlorhydrate		20 "
Acide glutamique	2 cm^3	18 "
Glycine		20 "
Histidine		20 "
Isoleucine	8 "	12 "
Leucine	25 "	
Lysine chlorhydrate		20 "
Méthionine	6 "	14 "
Phénylalanine	20 "	
Proline		20 "
Sérine	6 "	14 "
Thréonine	10 "	10 "
Tryptophane	5 "	15 "
Tyrosine	10 "	10 "
Valine	20 "	

le phosphate dipotassique dans 100cm^3 d'eau, chacun des cinq autres sels dans 5cm^3 d'eau (soit en tout 145cm^3).

TABLEAU V

Sels

Sels	Poids pour 100cm^3 de milieu	Quantité à peser pour 1 litre
$FeSO_4$ 7 H_2O	0,2 mg	20 mg
$CaCl_2$ 2 H_2O	0,2 mg	20 mg
$MnSO_4$ H_2O	1 mg	100 mg
$MgSO_4$ 3 H_2O	4 mg	400 mg
NaCl	0,2 mg	20 mg
K_2HPO_4	100 mg	10 g
KH_2PO_4	100 mg	10 g

L'expérience nous a montré que pour éviter au maximum la formation de précipité, nous avions intérêt à verser dans l'ordre suivant (dans un ballon d'un litre), chacune des solutions des sels suivants : ClNa, Cl_2Ca, SO_4Mn, SO_4Mg, PO_4HK_2, 855cm^3 d'eau (représentant la quantité nécessaire pour compléter à un litre), PO_4H_2K, SO_4Fe.

La solution de sels est à conserver au réfrigérateur à +4ºC. Il faut agiter avant chaque prélèvement, afin d'homogénéiser la solution qui peut être légèrement trouble.

VITAMINES

Comme pour les sels, les vitamines sont à employer à doses constantes dans tous les milieux. Nous préparons une solution de chacune d'elles, puis une solution finale dont 5cm^3 seront à utiliser pour 100cm^3 de milieu.

Les quantités de chaque vitamine, pour 100cm^3 de milieu, sont les suivantes :

- Biotine	0,05 µg
- Acide para-amino-benzoïque	1 "
- Pantothénate de calcium	40 "
- Pyridoxine	40 "
- Thiamine	40 "

20mg de chacune sont à peser. Nous dissolvons :

- Biotine dans 1 litre d'eau
- Acide para-amino-benzoïque dans 1 litre d'eau
- Thiamine, pyridoxine, pantothénate ensemble dans 1 litre d'eau.

Nous disposons ainsi de trois solutions dont nous prélevons et mélangeons :

- Thiamine, pyridoxine, pantothénate	800 cm^3
- Biotine	10 "
- Acide para-amino-benzoïque	20 "
- à compléter avec de l'eau	170 "

La solution contenant toutes les vitamines étant ainsi obtenue, nous en prélevons une certaine quantité que nous stérilisons par filtration à travers un filtre SEITZ dans lequel est ajustée une membrane millipore.

Le liquide filtré est ensuite réparti stérilement dans des ampoules stériles de 5 cm^3 et un contrôle de stérilité en eau peptonée est effectué.

GLUCOSE

Nous l'utilisons à raison de 0,5g pour 100cm^3 de milieu.

EXEMPLE DE PREPARATION DE 100cm^3 DE MILIEU

Dans un ballon de 250cm^3, nous répartissons :

- les quantités nécessaires d'acides aminés,
- 10cm^3 de solution de sels,
- le glucose que nous dissolvons dans les solutions déjà versées,
- la quantité d'eau nécessaire pour compléter à 95cm^3.

Nous ajustons aux environs de pH 7,2 (estimé le plus favorable à la croissance et au métabolisme), en notant la quantité de soude N 1/10 ajoutée, et stérilisons à l'autoclave 30 minutes à 110ºC.

Le milieu une fois refroidi, nous y ajoutons stérilement le contenu d'une ampoule à 5cm^3 de vitamines.

Les milieux sont à conserver au réfrigérateur à +4ºC.

Ils seront à répartir stérilement :

- dans des tubes stériles pour anaérobies, à raison de 5cm^3 par tube, ceci afin de réaliser des premières cultures et des subcultures en ampoules scellées sous vide,

- dans un Erlenmeyer stérile que nous décrirons plus loin, à raison de la moitié du volume total obtenu après ajustage du pH (soit environ 50cm^3).

COMPOSITION DES MILIEUX EN FONCTION DES ACIDES AMINES

Ainsi que nous l'avons déjà signalé, les différents milieux que nous avons utilisés varient uniquement en fonction des acides aminés, les sels, les vitamines et le glucose étant toujours introduits dans les mêmes proportions.

Nous avons systématiquement employé le milieu nº1 comprenant les 17 acides aminés, réunis sur le tableau VI, pour chaque germe étudié.

Puis nous avons supprimé les deux acides soufrés : cystéine et méthionine, afin de contrôler qu'en leur absence et en cas de culture positive, il n'y a pas formation d'hydrogène sulfuré et d'autres dérivés soufrés.

Nous avons ensuite diminué peu à peu le nombre des acides aminés jusqu'au moment où la culture était pratiquement nulle. Sur quels critères nous sommes - nous basée ? Il est évident qu'avec 17 acides aminés au départ, le nombre des combinaisons est très élevé et qu'il n'est pas question de les mettre toutes en pratique.

Nous avons donc d'une part éliminé les acides paraissant avoir un rôle similaire à cause d'une structure chimique voisine : monoacide, diacide, etc. D'autre part, nous nous sommes inspirée de formules ayant déjà été utilisées par certains auteurs pour la culture de germes en milieux synthétiques.

Nous étudierons en détail ces différents milieux au chapitre des germes pour lesquels nous les avons employés.

TABLEAU VI :

Nº des milieux	1	2	3	4	5	6	7	8
Nombre d'acides aminés	17	15	14	13	13	12	12	10
Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+
Acide aspartique			+		+			+
Cystéine	+		+	+				
Acide glutamique	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+		+	+	+		+
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+	+				+	
Leucine	+	+	+					
Lysine	+	+					+	
Méthionine	+		+					
Phénylalanine	+	+	+	+	+	+	+	
Proline	+	+		+	+	+	+	+
Sérine	+	+		+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+	+		
Tryptophane	+	+	+	+	+	+	+	
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+

Composition des milieux en acides aminés

Nº des milieux	9	10	11	12	13	14	15	16
Nombre d'acides aminés	9	7	7	7	6	6	6	5
Alanine	+							
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+
Acide aspartique								
Cystéine			+					
Acide glutamique	+	+	+	+	+		+	
Glycine	+							
Histidine	+							
Isoleucine		+				+		+
Leucine								
Lysine		+				+	+	
Méthionine				+				
Phénylalanine		+				+	+	+
Proline	+		+	+	+			
Sérine	+		+	+	+			
Thréonine								
Tryptophane								
Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+

C H A P I T R E III

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

SOUCHES MICROBIENNES

Nous avons employé les souches fournies par PREVOT (Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur de Paris) et utilisées par LABARRE (50) lors de sa thèse.

Nous les conservons et les entretenons en ampoules scellées sous vide, en bouillon viande-foie glucosé à 1 p.1000. Nous partons toujours d'une souche repiquée la veille.

PREMIERES CULTURES ET SUBCULTURES

Nous n'ensemençons pas directement dans l'Erlenmeyer cette culture de 24h., mais nous faisons d'abord une première culture en milieu synthétique afin d'épuiser tous les éléments nutritifs apportés par le bouillon viande-foie, puis une subculture à partir de cette première culture.

CULTURE DANS L'ERLENMEYER

L'appareil dans lequel nous cultivons le germe dont nous voulons étudier le dégagement gazeux est un Erlenmeyer modifié de la façon suivante (27) (Figure 1) : à sa partie supérieure un rodage mâle permet d'adapter un système comprenant un rodage femelle surmonté d'un robinet permettant la liaison avec une trompe par l'intermédiaire de joints rodés. Les robinets et les joints rodés sont graissés avec de l'Apiezon H, lubrifiant absolument étanche, à base d'hydrocarbures saturés à poids moléculaires élevés, et stable à haute température.

Figure 1 - Dispositif utilisé pour les cultures sous vide

Le rodage supérieur est obturé à l'aide d'un bouchon de coton cardé, le robinet reste ouvert et l'ensemble est stérilisé 30 minutes à 120ºC à l'autoclave.

$50cm^3$ de milieu sont introduits stérilement dans l'Erlenmeyer et ensemencés à l'aide du contenu du tube où est effectuée la subculture lorsque celle-ci est suffisamment riche (trouble apparent), ce qui peut demander plusieurs jours selon la composition du milieu.

Nous y réalisons le vide à l'aide d'une pompe à palettes jusqu'à une valeur correspondant à une pression résiduelle d'environ 15mm de mercure. Nous fermons le robinet de l'Erlenmeyer et nous le laissons à l'étuve à 37ºC le temps suffisant pour que le milieu de culture devienne trouble.

PRELEVEMENT DES GAZ

Nous utilisons une trompe à chute de mercure type SPRENGEL (40) (Figure 2).

Le principe en est le suivant : des gouttelettes de mercure formant chapelet emprisonnent des bulles de gaz que l'on recueille dans une éprouvette sur une petite cuve à mercure.

La trompe se compose d'un tube A de 1 à 3mm de diamètre et de 1,25mm de longueur. A sa partie supérieure se trouve une petite ampoule C portant une tubulure T par laquelle on met la trompe en relation avec l'appareil contenant les gaz à prélever et un tube D de 6mm de diamètre et 80cm de longueur par où arrive le mercure, mis lui-même en relation par l'intermédiaire d'un tube de caoutchouc souple E portant une pince à vis, avec le tube F sur lequel se trouve en charge une réserve de mercure G.

En règlant convenablement la pince à vis, on fait couler le mercure à une vitesse maximum permettant la réalisation d'un chapelet de bulles dans le tube A. La hauteur totale du chapelet est telle que la somme des longueurs des colonnes de

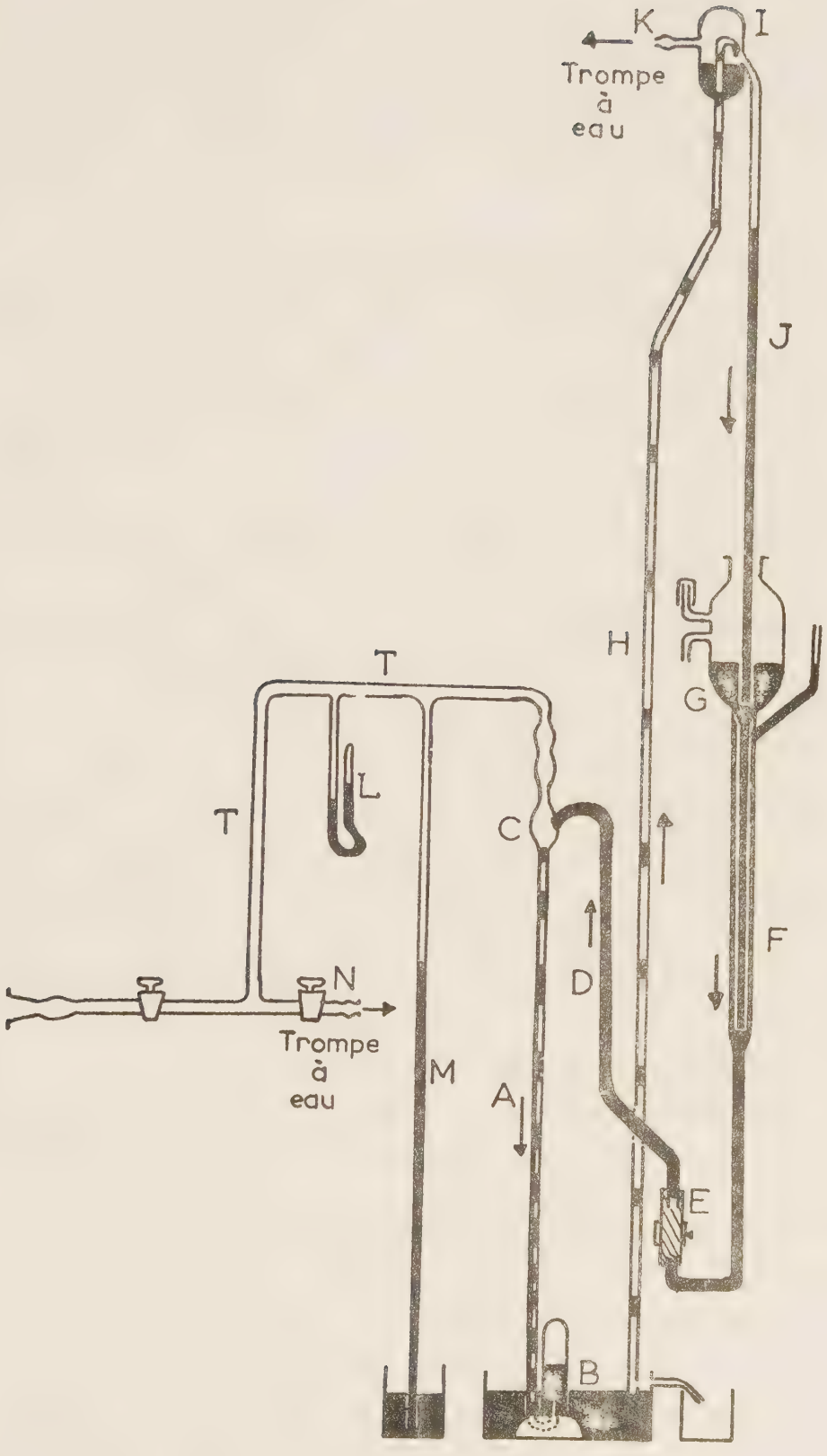

Figure 2 - Trompe de SPRENGEL avec remontée automatique du mercure

mercure partielles soit égale à la hauteur barométrique diminuée de la pression des gaz dans le récipient où s'effectue le prélèvement. Lorsque tombe une nouvelle goutte de mercure, elle capte une nouvelle bulle de gaz, mais au-delà d'une certaine vitesse le mercure formant une colonne continue n'entraîne plus de gaz.

Un dispositif spécial permet la remontée automatique du mercure. Un tube de verre H, de 3mm de diamètre et d'environ 230cm de longueur, plonge dans la petite cuve B et se termine à sa partie supérieure par une ampoule sur laquelle débouchent deux tubes :

- l'un J, à sa base, de 100cm de longueur, permettant le retour du mercure dans le réservoir G,
- l'autre, qui par un ajutage K permet la relation avec une trompe à eau.

Sous l'action de l'aspiration produite par cette dernière, le mercure monte en J et en H. Un trou très fin pratiqué en H, légèrement au-dessus du niveau du mercure de la cuve B, provoque une aspiration d'air qui brise la colonne de mercure en fragments et permet la remontée d'un chapelet de bulles jusqu'à l'ampoule I d'où le mercure retombe dans le réservoir G.

Cette trompe permet de réaliser un vide de 10^{-2}mm de mercure, soit sensiblement la tension de vapeur de mercure à la température ordinaire.

Un dispositif intermédiaire permet le prélèvement des gaz contenus dans l'Erlenmeyer (Figure 3). Il se compose d'un rodage suffisamment large afin de recevoir une nacelle en porcelaine contenant du chlorure de calcium destiné à déshydrater les gaz ayant normalement de la vapeur d'eau, dans les conditions de température et de pression de l'expérience.

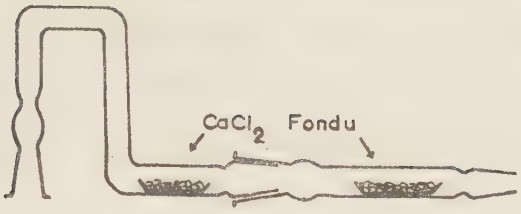

Figure 3 - Allonge de raccordement à la trompe de SPRENGEL.

De plus, sur la tubulure T, se branchent :

- un manomètre différentiel L, contrôlant le vide réalisé,
- un manomètre vertical indiquant la pression existant dans l'appareil,
- une tubulure latérale N à robinet rodé, permettant une mise en liaison avec une trompe à eau ou une trompe à palettes, afin de réaliser un premier vide dans l'appareil.

L'Erlenmeyer contenant la culture, robinet fermé, est mis en relation avec la trompe. Nous obtenons un vide préalable rapide en branchant l'ensemble de l'appareil sur une pompe à palettes, puis nous parachevons le vide à l'aide de la trompe à mercure, à faible vitesse d'extraction.

Nous prélevons ensuite les gaz qui sont reçus dans une éprouvette.

VERIFICATION DE LA PURETE DE LA CULTURE

A chaque étape de la mise en culture, nous vérifions l'absence de contaminations par une coloration de Gram sur plusieurs étalements sur lame. Nous avons souvent constaté, dans les milieux assez pauvres en acides aminés, des formes filamenteuses, très longues, sinueuses, parfois granuleuses et renflées sur une certaine longueur.

Une fois les gaz prélevés et analysés, nous reportons quelques gouttes du contenu de l'Erlenmeyer dans un milieu viande-foie glucosé et constatons, après un séjour de 24h à 37ºC, le retour aux formes habituelles du germe.

ANALYSE DES GAZ SUR LA CUVE A MERCURE

Nous utilisons la méthode générale d'analyse des gaz sur la cuve à mercure (40).

Nous mesurons d'abord le volume total des gaz recueillis, puis nous procédons à une analyse qualitative tout en déterminant les pourcentages en volume de chacun des gaz.

Pour ce faire, nous appliquons la méthode de séparation par absorption, méthode exacte et sûre, fondée sur le principe suivant : un réactif approprié, solide ou liquide, mis au contact d'un mélange gazeux, absorbe sélectivement un constituant donné, et le fait disparaître du mélange.

En mettant successivement un volume donné d'un mélange gazeux en présence de différents réactifs et en mesurant le volume gazeux résiduel après chaque absorption, on peut ainsi effectuer simultanément l'analyse qualitative de chaque constituant, sa séparation par absorption, son volume et par suite sa concentration (pourcentage en volume).

Nous prélevons donc un certain volume de gaz que nous mesurons à l'aide d'une jauge et nous décelons les gaz suivants, chacun à l'aide d'un réactif propre :

- Hydrogène sulfuré révélé par absorption sur un cristal humide de sulfate de cuivre qui noircit.
- Anhydride carbonique par de l'hydroxyde de potassium en solution saturée.
- Oxygène : son absence est contrôlée par passage du gaz sur pyrogallol alcalin, solution aqueuse à 30 p.cent de pyro-

gallol préparée depuis plusieurs semaines afin d'éviter une formation ultérieure d'oxyde de carbone lors de l'absorption de l'oxygène et saturée par des pastilles de potasse.

- Hydrogène : à ce stade, nous procédons à l'analyse eudiométrique. L'eudiomètre à mercure se compose d'une éprouvette graduée en verre épais, dont la partie supérieure est traversée par deux fils de platine ou de tungstène, distants de 1 à 2mm. Le volume restant et mesuré du gaz est introduit dans l'eudiomètre, ainsi qu'environ un peu plus de la moitié de son volume d'oxygène. L'étincelle électrique passant dans le mélange fait se combiner l'oxygène et l'hydrogène. La différence entre les volumes avant et après eudiométrie représente le volume d'eau formé et dont les deux tiers correspondent à celui de l'hydrogène.
- Composés carbonés divers, produisant notamment de l'anhydride carbonique et de l'eau après eudiométrie. L'anhydride carbonique sera retrouvé par absorption du gaz sur une pastille de potasse.
- L'oxygène inutilisé est absorbé par le pyrogallol alcalin.
- Le gaz résiduel représente des gaz inertes, en particulier l'azote et l'argon à l'état de traces.

La température et la pression auront été relevées afin de procéder aux corrections relatives à ces mesures et à les ramener aux conditions normales, habituellement choisies à 0ºC. et 760mm de mercure.

SPECTROMETRIE DE MASSE

L'analyse sur la cuve à mercure ne permettant pas de déceler des composés insoupçonnés ou à l'état de traces, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse qui, de plus, apporte une confirmation des résultats initialement obtenus.

De nombreux ouvrages (7,8,58,59,81) et publications (15,16, 17,18,26,55) ont été décrits à son sujet.

C'est une méthode permettant de séparer des particules électrisées positivement.

Voici,passées en revue,les différentes parties dont se compose l'appareil dont nous avons disposé, le spectromètre de masse ATLAS, type CH 4 (Figure 4), ainsi que les réactions s'effectuant dans chacune d'entre elles :

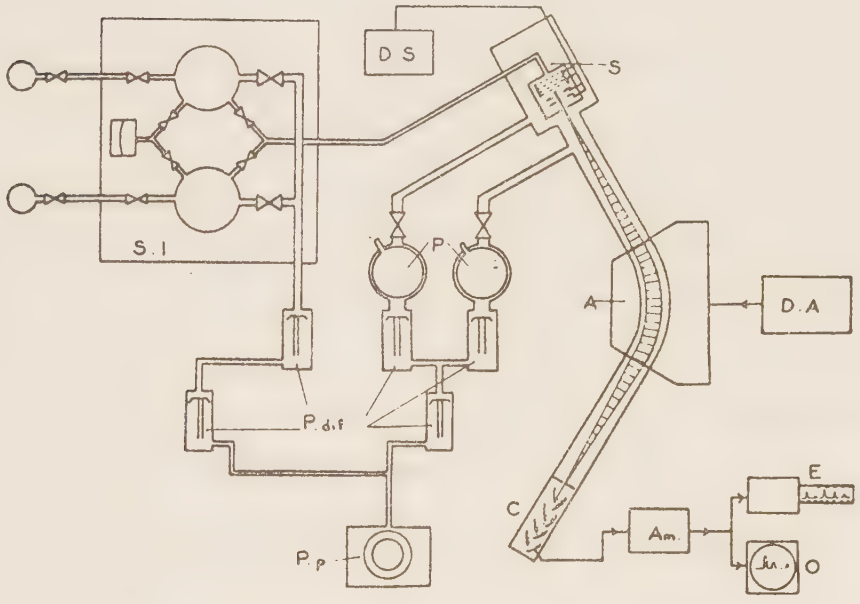

Figure 4 - Schéma d'un spectromètre de masse du type ATLAS CH_4

S.I. : système d'introduction
S : source d'ionisation
A : tube analyseur
C : collecteur
Am : amplificateur
E : enregistreur
O : oscilloscope
P.dif. : pompes à diffusion
P.p. : pompe à palette
P : pièges à azote liquide

- un système d'introduction dans lequel un micromanomètre à membrane permet de mesurer d'une façon précise le volume de gaz que l'on veut analyser.

- une chambre d'ionisation : un filament de tungstène chauffé à 250ºC émet un bombardement électronique d'une énergie de 70eV qui transforme les molécules gazeuses en ions positifs par arrachement d'un électron selon la formule $M + e = 2e + M^+$

- un système d'accélération des ions positifs formés, constitué par des plaques à potentiel négatif élevé et permettant d'uniformiser l'énergie cinétique des ions de masse identique, mais provenant de parties différentes de la source d'ionisation.

- des fentes réglables corrigeant la dispersion des ions et les dirigeant en faisceaux.

- un tube analyseur consistant en un champ d'induction uniforme magnétique. Celui-ci a pour but de provoquer une déviation de la trajectoire des ions. Cette déviation sera sous la double dépendance :

1) de leur charge : plus la charge est considérable, plus les particules seront attirées,

2) de leur masse : plus la masse est grande, moins elles seront déviées.

Par suite de cette déviation, les ions ayant la même valeur $\frac{m}{e}$ sont focalisés en un même point. La variation progressive du champ magnétique permet de rassembler en différents faisceaux les ions suivant leurs valeurs $\frac{m}{e}$ croissantes.

- un collecteur (cage de FARADAY) reçoit les faisceaux successifs d'ions qui vont se décharger et par suite donner naissance à un courant dont l'intensité est proportionnelle à celle du courant ionique.

- un amplificateur électronique reçoit et amplifie le courant venu du collecteur.

- enfin un enregistreur, pouvant fonctionner sous des sensibilités différentes, mesure le courant sous forme de pics correspondant chacun à un rapport $\frac{m}{e}$ déterminé.

Il est à remarquer que le bombardement électronique provoque, en plus de l'ionisation, des dissociations de molécules réduites ainsi en fragments dont certains seront ionisés et spécifiques de la molécule native.

En connaissant au départ le spectre de masse de chaque composant, on peut analyser un mélange, le spectre du mélange étant la somme des spectres individuels.

C H A P I T R E IV

R E S U L T A T S

Dans la famille des CLOSTRIDIACEAE (ordre des CLOSTRIDIALES), nous avons étudié d'une part Welchia perfringens, d'autre part dans le genre Clostridium, les germes suivants : Clostridium septicum, Clostridium oedematiens, Clostridium histolyticum, Clostridium sporogenes, Clostridium bifermentans.

Dans la famille des PLECTRIDIACEAE (ordre des PLECTRIDIALES), nous avons étudié Plectridium putrificum.

Pour chaque germe, nous rappelons d'abord les travaux antérieurs concernant :

- les milieux synthétiques expérimentés,
- la production de gaz obtenue.

Après avoir indiqué l'origine de la souche employée, nous détaillons ensuite la composition en acides aminés des différents milieux utilisés, puis nous exposons et comparons entre eux les résultats obtenus concernant le volume gazeux total dégagé, ainsi que sa composition exprimée en pourcentages (en volume).

Dans le chapitre suivant, nous tenterons d'établir une comparaison entre les résultats obtenus pour chaque souche.

WELCHIA PERFRINGENS souche LECHIEN

Ancien Bacillus perfringens (VEILLON et ZUBER,1898) (103)

TRAVAUX ANTERIEURS

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude de milieux chimiquement définis en vue de la culture de Welchia perfringens.

BALLENTINE et coll. (1) essayèrent un milieu semi-synthétique, suivis en 1947 par BOYD,LOGAN et TYTELL (19) qui mirent au point un milieu entièrement synthétique dans lequel 13 acides aminés se montrent absolument indispensables, parmi lesquels l'acide glutamique, la tyrosine, l'arginine et la sérine.

L'année suivante, les mêmes auteurs (20) définissent un autre milieu comprenant 19 acides aminés , deux bases, des vitamines, des sels et du glucose.

En 1948 et 1949, WEBB (104,105) étudie l'importance de l'ion Mg^{++}, et en 1951, SHANGAR et BARD (91) concluent que les ions métalliques nécessaires à la croissance de Welchia perfringens sont K^{+}, Ca^{++}, Mg^{++} et Fe^{++}. Ces mêmes auteurs (92), en 1955 , comparent l'action du magnésium et du cobalt.

En 1957, FUCHS et BONDE (39) déterminent les exigences, différentes d'une souche à l'autre, en sels minéraux et acides aminés parmi lesquels la glycine, la lysine et la sérine sont nécessaires, de même que l'acide aspartique.

BOYD et SLONIN (21), en 1958, étudient l'utilisation des acides aminés, tandis que BLAWDT, BOROWSKI et SAULEWIEZ (14) trouvent une action stimulante à l'extrait aqueux de pomme de terre ajouté à un milieu synthétique.

En 1962, Welchia perfringens est cultivé par RUNOVA (85) dans un milieu comprenant tous les acides aminés, des sels minéraux, du glucose, du pantothénate de calcium et de la pyridoxine.

En ce qui concerne l'étude du dégagement gazeux, WOLF et HARRIS (118),utilisant comme milieu de culture le lait et l'eau peptonée, ont trouvé un volume de 1859 à 3820cm^3 par litre de lait avec un pourcentage de 77 à 63 pour l'ahydride carbonique, et 23 à 37 pour l'hydrogène, tandis qu'avec l'eau peptonée le volume était de 146 à 186cm^3.

Quant aux travaux de LABARRE (50), portant sur la culture de ce germe en milieu au thioglycolate, les résultats en sont les suivants, en composition centésimale et pour un volume total de 130cm^3 (0ºC., 760mm de mercure).

H_2S	0,6 à 0,2
CO_2	47,2 à 49,6
H_2	51,7 à 50
N_2	0,5 à 0,2

Plus récemment, BENICHOU (6) après alcalinisation par la soude a procédé à l'extraction des gaz et a pu identifier de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

TABLEAU VII

Composition en acides aminés des différents milieux utilisés sous un volume de 50cm^3 pour la culture de Welchia perfringens

Numéros des milieux		1	2	3	5	8
Nombre d'acides aminés		17	15	14	13	10
Alanine	0,04 g	+	+	+	+	+
Arginine	0,282 g	+	+	+	+	+
Acide aspartique	0,0102 g			+	+	+
Cystéine	0,1102 g	+		+		
Acide glutamique	0,0102 g	+	+	+	+	+
Glycine	0,012 g	+	+		+	+
Histidine	0,0201 g	+	+	+	+	+
Isoleucine	0,0497 g	+	+	+		
Leucine	0,156 g	+	+	+		
Lysine	0,1497 g	+	+			
Méthionine	0,0596 g	+		+		
Phénylalanine	0,099 g	+	+	+	+	
Proline	0,0494 g	+	+		+	+
Sérine	0,0997 g	+	+		+	+
Thréonine	0,0999 g	+	+	+	+	
Tryptophane	0,0047 g	+	+	+	+	
Tyrosine	0,0253 g	+	+	+	+	+
Valine	0,1989 g	+	+	+	+	+

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES MILIEUX UTILISES

Nous avons utilisé une souche isolée en 1915 par WEINBERG et SEGUIN chez un blessé du nom de LECHIEN atteint d'une gangrène gazeuse mortelle.

Dans le tableau VII , sont reportés les acides aminés et leurs quantités entrant dans 50cm^3 de chacun des milieux utilisés.

Nous avons cultivé Welchia perfringens dans le milieu complet, puis dans le même milieu privé de la cystéine et de la méthionine. Nous avons ensuite employé le milieu minimum (nº3),mis au point par FUCHS et BONDE en 1957 (39), et dans la composition duquel entre un acide aminé supplémentaire, l'acide aspartique, lequel, d'après les travaux d'IZUMI (43) en 1962, fait partie des oligopeptides de la paroi. Il contient en outre du chlorure d'ammonium (absent des sels que nous avons employés) et de l'adénine, mais nous n'avons pas utilisé cette dernière, faisant varier seulement les acides aminés.

Ce milieu n'ayant pas donné de résultat positif après plusieurs essais, nous l'avons modifié en supprimant la cystéine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine et en ajoutant la glycine, la proline et la sérine (milieu nº5).

Ayant obtenu une culture suffisante dans ce milieu, nous avons ultérieurement fait trois essais simultanés :

1- avec le milieu nº8, comprenant l'acide aspartique et l'acide glutamique,

2- avec ce même milieu sans acide aspartique mais avec acide glutamique,

3- avec ce même milieu sans acide glutamique mais avec acide aspartique, ceci dans le but de déceler une utilisation

préférentielle du germe pour l'un ou l'autre de ces deux acides. Aucun de ces essais ne fut concluant et il semble bien que, tout au moins pour la souche que nous avons utilisée, l'acide aspartique ne soit pas indispensable puisque les milieuxnº1 et 2 ne le contenant pas ont donné un résultat positif.

VOLUME TOTAL ET COMPOSITION CENTESIMALE DU DEGAGEMENT GAZEUX

Les milieux nº1, 2 et 5 sont les seuls à avoir donné lieu à un dégagement gazeux après un séjour sous vide de quatre à cinq jours des Erlenmeyers à l'étuve à 37ºC. Les gaz furent ensuite prélevés en totalité à la trompe de SPRENGEL.

Dans le tableau VIII, sont reportés les résultats moyens du volume total et des pourcentages en volume des différents composants des gaz, suivant chaque milieu étudié ($50cm^3$).

TABLEAU VIII

Volume total et composition centésimale des gaz totaux dégagés par la culture de Welchia perfringens dans $50cm^3$ des milieux nº1,2 et 5

Milieux	1	2	5
Volume total (0ºC, 760mm Hg)	$148cm^3$	$159cm^3$	$107cm^3$
Composés gazeux			
CO_2	49,5	55	47
H_2	49,8	44,9	52,8
N_2	0,7	0,1	0,2

La spectrométrie de masse n'a pas identifié d'autres composants que ceux décelés sur la cuve à mercure.

Le volume total (0ºC., 760mm Hg) sensiblement le même avec 17 et 15 acides aminés, diminue avec 13 acides.

Le milieu nº1, contenant de la cystéine et de la méthionine, ne donne pas lieu à un dégagement d'hydrogène sulfuré, que KAHN (44) et plus tard BILLY (12) avaient décelé parmi les gaz dégagés par Welchia perfringens. D'après FUCHS et BONDE (39), l'hydrogène sulfuré est justement libéré à partir de la cystéine (de même qu'à partir de la cystine, des sulfites, des thiosulfates et du glutathion). Le milieu au thioglycolate de sodium donne également naissance à de l'hydrogène sulfuré (0,2 à o,6 p.cent en volume). De plus la cystéine ne semble pas indispensable puisque le germe pousse en son absence.

Les pourcentages en volume d'anhydride carbonique et d'hydrogène sont sensiblement égaux et l'on retrouve un rapport CO_2/H_2 voisin de 1, comme dans le milieu au thioglycolate. Précédemment, avec des milieux très différents, des auteurs tels que WOLF et HARRIS (118), puis KENDALL, DAY et WALKER (45) avaient déterminé un tiers d'anhydride carbonique et deux tiers d'hydrogène, pour des volumes totaux très variables.

CONCLUSION

Nous avons pu cultiver Welchia perfringens, souche LECHIEN, dans trois milieux différents, le milieu minimum comprenant 13 acides aminés, à savoir : alanine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, glycine, histidine, phénylalanine, proline, sérine, thréonine, tryptophane, tyrosine et valine.

Malgré la présence de la cystéine, nous n'avons pas observé de dégagement d'hydrogène sulfuré, contrairement aux auteurs précédents ayant décelé l'existence de ce gaz.

Les proportions d'anhydride carbonique et d'hydrogène recueillis sont très voisines l'une de l'autre, ceci pour les trois milieux.

CLOSTRIDIUM SEPTICUM, souche TO

Ancien Vibrion septique (PASTEUR,1877)(65,66)

TRAVAUX ANTERIEURS

RYAN et coll. (86,87) dans leurs recherches sur des milieux synthétiques et les facteurs de croissance de Clostridium septicum ont pu le cultiver en présence de sels, sucre, acides aminés purifiés de la caséine, glutamine, tryptophane, cystéine et cinq vitamines. La pyrimidine et l'uracile sont nécessaires.

En ce qui concerne l'étude des gaz, WOLF (115) cultivant Clostridium septicum dans du lait, a trouvé un dégagement gazeux d'un volume de 977cm^3 par litre de milieu avec un pourcentage de 40 pour l'anhydride carbonique et de 60 pour l'hydrogène.

LABARRE (51,50) à partir d'une culture dans 50cm^3 de milieu au thioglycolate de sodium, a déterminé un volume gazeux total de 91cm^3 (0ºC.,760mm Hg) dont les composants et leurs pourcentages en volume sont les suivants :

CO_2	45,6 à 44,8
H_2	51,4 à 52,9
N_2	3 à 2,3

Après alcalinisation par la soude et extraction des gaz, BENICHOU (6) a identifié les composants suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, des traces d'isopropanol, de l'éthanol, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES MILIEUX UTILISES

Nous avons utilisé une souche isolée d'un faux charbon symptomatique d'une génisse, à Toulouse, en 1945.

Clostridium septicum s'est révélé un germe difficile à cultiver dans les milieux que nous avions préparés. Seul le milieu complet s'est montré favorable à une pousse normale. Il est à noter que, lors des premiers essais, les seules vitamines utilisées étaient la biotine, la thiamine et l'acide para-amino-benzoïque et les cultures se montraient insignifiantes. Ce n'est qu'après avoir ajouté du pantothénate de calcium et la pyridoxine que nous avons pu obtenir une culture satisfaisante.

Plusieurs essais en milieu nº2 se sont révélés négatifs.

VOLUME TOTAL ET COMPOSITION CENTESIMALE DU DEGAGEMENT GAZEUX

La culture du germe dans un Erlenmeyer contenant 50cm^3 de milieu a donné lieu, après une douzaine de jours à l'étuve à 37º sous vide, à un dégagement gazeux dont le volume total a été en moyenne de 124cm^3 (0ºC., 760mm Hg). Dans le tableau IX sont reportées les valeurs moyennes des différents composants.

TABLEAU IX

Clostridium septicum

Composition centésimale des gaz totaux

Composés gazeux	Pourcentages en volume
CO_2	49,4
H_2	49,9
N_2	0,7

Il est à noter :

- que la proportion sensiblement égale d'anhydride et d'hydrogène se rapproche beaucoup de celle obtenue avec le milieu au thioglycolate,

- et que malgré la présence des deux acides aminés soufrés, il n'y a pas de dégagement d'hydrogène sulfuré.

Par contre, il n'y a pas de culture dans le milieu nº2 où la cystéine et la méthionine ont été supprimées. Bien que Clostridium septicum se montre incapable de dégager des produits soufrés, il semblerait probable que ces deux acides constituent un appert indispensable pour ce germe.

CONCLUSION

Clostridium septicum souche TO n'a pu être cultivé que dans le milieu complet comprenant 17 acides aminés. 50cm^3 de

culture dans ce milieu ont donné lieu à une production importante de gaz, dont le volume est de 124cm^3 (0ºC., 760mm Hg), et dont les principaux composants sont l'anhydride carbonique et l'hydrogène en proportions sensiblement égales et déjà mises en évidence pour le milieu au thioglycolate (51,50) alors que les résultats de WOLF (115) montraient un rapport CO_2/H_2 de 2/3 environ pour différents milieux. L'azote fut décelé en quantité moindre que dans le milieu au thioglycolate étudié par LABARRE (51,50) et l'hydrogène sulfuré, signalé par KAHN (44) ne fut pas trouvé.

CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS, souche DELHOMME

Ancien Bacillus oedematiens (WEINBERG et SEGUIN,1915)(107)

TRAVAUX ANTERIEURS

La culture de Clostridium oedematiens en milieu synthétique n'a pas été effectuée,mais dans le bouillon viande-foie glucosé on observe un important dégagement gazeux composé d'un mélange d'anhydride carbonique et d'hydrogène, de même que dans la gélose profonde. La désamination des acides aminés est plus ou moins importante selon les souches.

WOLF (117) a cultivé ce germe dans le lait et a trouvé 755cm^3 par litre de milieu comme valeur extrême de dégagement gazeux, avec 52 p.cent d'anhydride carbonique et 48 p.cent d'hydrogène.

Il a établi un rapport CO_2/H_2 égal à 3/2, à partir d'une culture dans un milieu à la viande cuite.

Ce même rapport a été retrouvé par LABARRE (50) qui a cultivé Clostridium oedematiens dans un milieu au thioglycolate de sodium. Pour un volume gazeux total de 100cm^3 (0ºC., 760mm Hg) les composants et les pourcentages en volume sont les suivants :

H_2S	0,2
CO_2	60,7
H_2	38,3
Thiols	0,3
N_2	0,5

Après alcalinisation par la soude et extraction des gaz, BENICHOU (6) a pu identifier les composants suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, des traces d'isopropanol, de l'éthanol, du disulfure de diméthyle, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

ESSAIS DE CULTURE EN MILIEU SYNTHETIQUE

Nous avons utilisé la souche historique isolée en 1915 par WEINBERG et SEGUIN (107) d'un cas de gangrène gazeuse mortelle chez un blessé de guerre nommé DELHOMME.

Nous avons tenté à plusieurs reprises la culture de ce germe dans le milieu I, mais tous les essais se sont révélés négatifs.

CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM, souche TRO 2E

Ancien Bacillus histolyticus (WEINBERG et SEGUIN,1917)(109,110)

TRAVAUX ANTERIEURS

BULMASH et WEAVER (24) ont pu cultiver Clostridium histolyticum dans un milieu contenant 12 acides aminés : arginine, acide aspartique, cystéine, acide glutamique, histidine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, proline, thréonine, tyrosine, auxquels s'ajoutent riboflavine et glucose.

KONDRATIEVA et SHVEDOVA (47,48) ont déterminé qu'il peut n'utiliser pour son métabolisme que 10 acides : alanine, arginine, acide aspartique, cystéine, glycine, lysine, ornithine, sérine, thréonine, valine, à condition que des protéines se trouvent également dans le milieu.

Bien que ce germe soit réputé non gazogène, certains auteurs ont pu mettre en évidence la production d'une certaine quantité de gaz, faible, il est vrai, dans la plupart des cas.

WOLF et HARRIS (120), à partir d'une culture dans le lait, ont trouvé 328cm^3 par litre de milieu comme valeur extrême de dégagement gazeux, avec un pourcentage de 78,5 pour l'anhydride

et 21,5 pour l'hydrogène, tandis qu'à partir d'une culture en eau peptonée, le volume gazeux était de 25cm^3 avec 69 p. cent d'anhydride carbonique et 31 p.cent d'hydrogène.

LABARRE (50) en cultivant ce germe dans un milieu au thioglycolate, a trouvé un faible volume gazeux de 37cm^3 (0ºC., 760mm Hg) dont les composants et leurs pourcentages en volume sont les suivants :

H_2S	0,8
CO_2	84
H_2	14,1
Thiol : CH_3SH	0,1
N_2	1

BENICHOU (6) après alcalinisation par la soude et extraction des gaz, a pu identifier les composés suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, de l'éthanol, du propanol, des traces d'isobutanol et du butanol.

ESSAIS DE CULTURE EN MILIEU SYNTHETIQUE

Nous avons utilisé une souche isolée du sol de l'îlot de TROCMLIN (Cercle Antarctique) lors de recherches sur la flore anaérobie originelle, en 1948.

Nous avons tenté à plusieurs reprises la culture de ce germe dans le milieu nº 1 contenant les acides aminés des milieux synthétiques précédemment cités, mais n'avons jamais pu obtenir de culture suffisante.

CLOSTRIDIUM SPOROGENES, souche Go I

Ancien Bacillus sporogenes (METCHNIKOFF,1908) (60)

TRAVAUX ANTERIEURS

De nombreux auteurs ont successivement mis au point des milieux synthétiques pour Clostridium sporogenes, premier anaérobie a être ainsi cultivé.

KNIGHT et FILDES (46) utilisent un milieu semi-synthétique en 1933, puis, en 1935, FILDES et RICHARDSON (35) emploient un milieu à base d'acides aminés, parmi lesquels l'arginine, la leucine, la phénylalanine et la tyrosine sont indispensables.

En 1949, SHULL et PETERSON (93) ont établi que parmi la biotine, l'acide para-amino-benzoïque et l'acide nicotinique comme facteurs de croissance, seule la biotine est nécessaire tandis que l'isoleucine facilite la nutrition de Clostridium sporogenes.

D'après ces mêmes auteurs, la croissance est meilleure en présence du glucose, de l'arginine et de la tyrosine.

Pour CAMPBELL et FRANK (25), en 1956, sont indispensables l'arginine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine et la valine.

FAGUET et GONDOT (34) ont établi, en 1961, que le sulfate de cobalt stimule la croissance de Clostridium sporogenes.

En ce qui concerne l'étude des gas dégagés par ce germe, on peut citer WOLF et HARRIS (118) qui, en 1917, l'ont cultivé dans le lait et dans l'eau peptonée et ont déterminé 576 à 1062cm^3 comme valeurs extrêmes de dégagement gazeux par litre de lait, avec un pourcentage de 73 à 55 d'anhydride carbonique et de 27 à 45 d'hydrogène, tandis qu'avec l'eau peptonée le volume était de 360 à 340cm^3 avec 66 à 71 p.cent d'anhydride carbonique et 34 à 29 p.cent d'hydrogène.

LABARRE (51,50) a établi la composition centésimale suivante des gaz dégagés par Clostridium sporogenes cultivé en milieu au thioglycolate de sodium, pour un volume total de 90cm^3 (0ºC.,760mm Hg):

H_2S	3,3 à 3,4
CO_2	79,8 à 80,3
H_2	15,6 à 15,4
Thiols	0,5 à 0,2
N_2	0,8 à 0,7

Après alcalinisation à la soude et extraction des gaz, BENICHOU (6) a pu identifier les composés suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, de l'isopropanol, de l'éthanol, du disulfure de diméthyle, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES MILIEUX UTILISES

Nous avons employé une souche isolée en 1945 d'un cas de gangrène putride du gros orteil.

Le tableau X résume la composition en acides aminés des différents milieux (sous un volume de 50cm^3, dans lesquels nous avons tenté la culture de Clostridium sporogenes. Des neuf milieux utilisés, seuls quatre ont permis une culture appréciable du germe, à savoir les nº1, 2, 7 et 10.

Le nº1 représente le milieu complet, le nº2, le même sans les acides soufrés. Dans le nº7, ont été supprimées en outre la glycine, la leucine et la thréonine, tandis que le nº10 ne contient plus que sept acides aminés : l'arginine, l'acide glutamique, l'isoleucine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine et la valine. Trois parmi ces acides : arginine, phénylalanine et tyrosine avaient déjà été reconnus indispensables par l'ensemble des auteurs précédemment cités (35,93,25).

Il paraît intéressant de comparer entre elles les compositions de milieux voisins, dont certains seulement se sont montrés favorables à la croissance de Clostridium sporogenes.

Les acides soufrés ne semblent pas indispensables.

Dans les milieux nº4 et 6 contenant respectivement 13 et 12 acides aminés, on peut constater l'absence d'isoleucine et de lysine présentes dans les milieux nº 1 et 2. C'est pourquoi nous les avons réintroduites dans le milieu nº7 d'où nous avons retiré par contre la thréonine.

Parmi les milieux pauvres en acides aminés, seul le nº10 en contenant sept, s'est montré favorable. Dans le milieu nº14, il n'y a plus d'acide glutamique, le milieu nº15 ne renferme plus d'isoleucine et dans le nº16, l'acide glutamique et la lysine ont été supprimés.

Il semblerait donc que, dans un milieu minimum, l'acide glutamique, l'isoleucine et la lysine se montrent indispensables.

TABLEAU X

Composition en acides aminés des différents milieux utilisés sous un volume de 50cm^3 pour la culture de Clostridium sporogenes

Numéros des milieux		1	2	4	6	7	10	14	15	16
Nombre d'acides aminés		17	15	13	12	12	7	6	6	5
Alanine	0,04 g	+	+	+	+	+				
Arginine	0,282 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cystéine	0,1102 g	+		+						
Acide glutamique	0,0102 g	+	+	+	+	+	+		+	
Glycine	0,012 g	+	+	+	+					
Histidine	0,0201 g	+	+	+	+	+				
Isoleucine	0,0497 g	+	+			+	+	+		+
Leucine	0,156 g	+	+							
Lysine	0,1497 g	+	+			+	+	+	+	
Méthionine	0,0596 g	+								
Phénylalanine	0,099 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Proline	0,0494 g	+	+	+	+	+				
Sérine	0,0997 g	+	+	+	+	+				
Thréonine	0,0999 g	+	+	+	+					
Tryptophane	0,0047 g	+	+	+	+	+				
Tyrosine	0,0253 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	0,1989 g	+	+	+	+	+	+	+	+	+

VOLUME TOTAL ET COMPOSITION CENTESIMALE DU DEGAGEMENT GAZEUX

Dans le tableau XI sont consignés les résultats obtenus à l'issue de la culture de Clostridium sporogenes dans 50cm^3 de chacun des milieux nº1, 2, 7 et 10, sous vide, après deux à vingt jours à l'étuve à 37ºC.

TABLEAU XI

Volume total et composition centésimale des gaz totaux dégagés par la culture de Clostridium sporogenes dans 50cm^3 des milieux nº1,2,7 et 10

Milieux	1	2	7	10
Volume total (0ºC.,760mm Hg)	125cm^3	151cm^3	160cm^3	115cm^3
Composés gazeux				
H_2S	4,8			
CO_2	82,4	79,9	66,8	58,7
H_2	7,5	19,3	32,8	40,9
Thiols	4,5	Traces	Traces	Traces
N_2	0,8	0,8	0,4	0,4

Le volume total (0ºC.,760mm Hg) ne semble pas en rapport avec le nombre d'acides aminés puisqu'il est de 125cm^3 pour 17 acides et de 160cm^3 pour 12 acides. Il est encore assez important : 115cm^3 pour seulement 7.

L'analyse par la spectrométrie de masse a bien confirmé la présence d'hydrogène sulfuré et de méthane-thiol détectés sur la cuve à mercure et dont la production semble dépendre

du métabolisme des acides aminés soufrés (milieu nº1) puisqu'on ne les retrouve plus dans le milieu nº2 d'où ils ont été supprimés.

La proportion d'anhydride carbonique du milieu nº1 est sensiblement la même que dans le milieu au thioglycolate où LABARRE (51,50) a trouvé un rapport CO_2/H_2 supérieur à 4, tandis que pour WOLF et HARRIS (118) ce rapport était de 2 et pour WOLF (116) il était de 3, mais la proportion d'hydrogène étant seulement de 7,5 pour cent, on trouve un rapport CO_2/H_2 voisin de 11.

Au fur et à mesure de l'appauvrissement des milieux en acides aminés, on constate la diminution de la proportion d'anhydride carbonique, parallèlement à l'augmentation d'hydrogène et le rapport CO_2/H_2 devient un peu supérieur à 1.

Quant à l'azote, sa faible quantité ne permet pas de conclure à la production de ce gaz par le germe.

CONCLUSION

Clostridium sporogenes, souche GO 1 a pu être cultivé dans un milieu minimum de sept acides aminés (arginine, acide glutamique, isoleucine, lysine, phénylalanine, tyrosine, valine) dégageant un volume gazeux de 115cm^3 (0ºC., 760mm Hg). La production importante d'hydrogène sulfuré et de méthane-thiol semble sous la dépendance des acides soufrés. La proportion d'anhydride carbonique diminue avec le nombre des acides aminés tandis que celle de l'hydrogène augmente.

CLOSTRIDIUM BIFERMENTANS, souche TM

Ancien Bacillus bifermentans (TISSIER et MARTELLY,1902) (102,100,101)

TRAVAUX ANTERIEURS

SMITH et DOUGLAS (94) ont déterminé que, pour Clostridium bifermentans, les vitamines essentielles étaient : biotine, acide nicotinique, acide pantothénique et pyridoxal.

Selon PREVOT (20), la fermentation du bouillon viande-foie glucosé produit entre autres : de l'hydrogène sulfuré, de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène, et le type fermentaire gazeux normal est CO_2+H_2 à parties égales.

A partir d'une culture dans 50cm^3 de milieu au thioglycolate de sodium, LABARRE (50) a trouvé un volume gazeux total de 98cm^3 (0ºC., 760mm Hg), dont les composants et leurs pourcentages en volume sont les suivants :

H_2S	0,2
CO_2	79,5
H_2	19,5
Thiols	0,3
N_2	0,5

BENICHOU (6), après traitement à la soude et extraction des gaz, a pu identifier les composés suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol, des traces d'isopropanol, de l'éthanol, du disulfure de diméthyle, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

ESSAIS DE CULTURE EN MILIEU SYNTHETIQUE

C'est la souche historique isolée, en 1902, par TISSIER et MARTELLY (102) à partir de viande de boucherie en putréfaction, que nous avons utilisée.

Nous avons tenté à plusieurs reprises la culture de ce germe dans le milieu nº1, mais toujours sans succès, ce qui confirmerait que dans un milieu à base d'acides aminés, la croissance dépendrait probablement de la présence de peptides.

PLECTRIDIUM PUTRIFICUM, souche BIENSTOCK 1905

Ancien Bacillus putrificus, (BIENSTOCK,1884) (9,10)

TRAVAUX ANTERIEURS

Peu d'auteurs se sont intéressés à la culture de Plectridium putrificum en milieux synthétiques, ainsi qu'à l'étude de la composition des gaz dégagés par ce germe.

On peut citer BROWN (23) qui, en 1925, a trouvé une proportion d'anhydride carbonique atteignant 77 p.cent.

LABARRE (50), cultivant Plectridium putrificum dans un milieu au thioglycolate de sodium, a déterminé un volume de gaz dégagé de 108cm^3 (0ºC., 760mm de Hg) et a établi la composition centésimale suivante :

H_2S	0,5
CO_2	80,5
H_2	18,1
Thiols	0,3
N_2	0,6

BENICHOU (6), après traitement à la soude et extraction des gaz, a pu identifier les composés suivants : de la triméthylamine, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, du méthanol,

de l'isopropanol, de l'éthanol, du disulfure diméthyle, du propanol, de l'isobutanol et du butanol.

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES MILIEUX UTILISES

Nous avons utilisé la souche isolée par BIENSTOCK en 1905 et conservée ultérieurement par LOISEAU.

Nous reportons dans le tableau XII la composition en acides aminés des différents milieux expérimentés sous un volume de 50cm^3.

Partant de 17 acides aminés, nous sommes ainsi arrivée de proche en proche à 6, chiffre minimum en-dessous duquel tous nos essais ont abouti à des échecs. Les acides entrant dans la composition du dernier milieu sont les suivants : arginine (diaminé en C_5), acide glutamique (diacide en C_5), proline (iminé en C_5), sérine (alcool en C_3), tyrosine (aromatique en C_9), valine (monoacide en C_5). Un tel milieu renferme donc un représentant de chaque série de la classification habituelle des acides aminés.

Les acides soufrés font l'objet d'une étude particulière, mais ne se montrent pas indispensables.

VOLUME TOTAL ET COMPOSITION CENTESIMALE DU DEGAGEMENT GAZEUX

Les résultats moyens sont consignés dans le tableau XIII.

D'une manière générale, on sait que Plectridium putrificum possède un pouvoir protéolytique très élevé. Il dégrade les protéines en acides aminés, puis, selon PREVOT (80), il désamine ceux-ci en les décarboxylant et aboutit à la formation d'anhydride carbonique et d'ammoniac.

TABLEAU XII

Composition en acides aminés des différents milieux utilisés sous un volume de 50cm^3 pour la culture de Plectridium putrificum

Numéros des milieux		1	4	6	9	13	11	12
Nombre d'acides aminés		17	13	12	9	6	7	7
Alanine	0,04 g	+	+	+	+			
Arginine	0,282 g	+	+	+	+	+	+	+
Cystéine	0,1102 g	+	+				+	
Acide glutamique	0,0102 g	+	+	+	+	+	+	+
Glycine	0,012 g	+	+	+	+			
Histidine	0,0201 g	+	+	+	+			
Isoleucine	0,0497 g	+						
Leucine	0,156 g	+						
Lysine	0,1497 g	+						
Méthionine	0,0596 g	+						+
Phénylalanine	0,099 g	+	+	+				
Proline	0,0494 g	+	+	+	+	+	+	+
Sérine	0,0997 g	+	+	+	+	+	+	+
Thréonine	0,0999 g	+	+	+				
Tryptophane	0,0047 g	+	+	+				
Tyrosine	0,0253 g	+	+	+	+	+	+	+
Valine	0,1989 g	+	+	+	+	+	+	+

TABLEAU XIII

Volume total et composition centésimale des gaz dégagés par 50cm^3 de milieu de culture de Plectridium putrificum

Numéros des milieux	1	4	6	9	13	11	12
Nombre d'acides aminés	17	13	12	9	6	+ Cyst. 7	+ Méth. 7
H_2S	5,9	5				3,7	
CO_2	78,5	60	59,4	57,4	43,8	59,1	66,4
H_2	13,2	33,3	39,6	40,5	54,9	36,3	28,9
Thiols	Traces	0,7					Très fortes traces
N_2	2,4	1	1	2,1	1,3	0,9	4,7
Volume total en cm^3	126	90	114	80	53	93	52

On peut constater que le volume de gaz diminue sensiblement jusqu'au milieu nº 13 (6 acides), à peu près parallèlement au nombre d'acides présents dans le milieu, bien que la quantité de glucose demeure constante.

Avec 17 acides, milieu semblant assez complet, les résultats trouvés pour l'anhydride carbonique et l'hydrogène se rapprochent de ceux obtenus avec le milieu au thioglycolate où le rapport CO_2/H_2 est voisin de 4, tandis qu'ici ce rapport est de 6.

Au fur et à mesure que le nombre d'acides diminue, il apparaît que la proportion d'anhydride carbonique diminue elle aussi, tandis que celle d'hydrogène augmente, entraînant dans le milieu minimum un rapport CO_2/H_2 inférieur à 1.

La quantité d'azote trouvée se montre supérieure au volume résiduel de gaz dissous qui correspond sensiblement à 0,1-0,2cm^3 pour 50cm^3 de milieu. Il semble que nous soyons en présence d'une faible, mais réelle production d'azote, surtout dans le cas des milieux nº 1,9 et 12. Des expériences de cette nature mériteraient d'être reprises ultérieurement, en employant des acides aminés marqués à ^{15}N.

CAS DES ACIDES AMINES SOUFRES

Lorsqu'au milieu ne contenant que 6 acides (nº13), on ajoute soit de la cystéine, soit de la méthionine, on peut constater dans le cas de la cystéine une augmentation du métabolisme du germe, conduisant à la production d'un volume de gaz plus élevé et contenant de l'hydrogène sulfuré, trouvé également dans les milieux nº 1 et 4, dans la composition desquels entre aussi la cystéine.

Par contre la méthionine conduit à un volume total de gaz sensiblement égal à celui du milieu nº13 et est beaucoup moins génératrice de produits soufrés que la cystéine.

CONCLUSION

Plectridium putrificum, souche BIENSTOCK 1905, a pu être cultivé dans un milieu minimum de 6 acides aminés(arginine, acide glutamique, proline, sérine, tyrosine, valine), dégageant un volume gazeux de 53cm^3 (0ºC.,760 Hg). La production d'hydrogène sulfuré semble dépendre de la présence de la cystéine.

CHAPITRE V

DISCUSSION DES RESULTATS

Nous avons expérimenté 16 milieux différents (Tableau VI) Seuls 11 milieux, dont la composition en acides aminés est reportée dans le tableau XIV , se sont montrés favorables à la croissance de certains germes, les 5 autres milieux (nº 3,8,14,15 et 16) n'ayant donné lieu à aucune culture. Les colonnes dans lesquelles figure un nom de bactérie correspondent au milieu utilisé uniquement pour cette bactérie, les milieux nº1 et 2 ayant été employés pour plusieurs bactéries.

Du point de vue de l'exigence des germes :

Welchia perfringens	requiert	un	minimum	de	13	acides aminés
Clostridium septicum	"	"	"		17	" "
Clostridium sporogenes	"	"	"		7	" "
Plectridium putrificum	"	"	"		6	" "

ces deux derniers germes se développant dans des milieux relativement pauvres.

Du point de vue des acides aminés, on peut constater que quatre furent toujours employés : arginine, acide glutamique, tyrosine et valine.

TABLEAU XIV :

Numéros des milieux	1	2	4	5	6	7
Nombre d'acides aminés	17	15	Pl. putrif. 13	W. perf. 13	Pl. putrif. 12	Cl. spor. 12
Alanine	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Acide aspartique				+		
Cystéine	+		+			
Acide glutamique	+	+	+	+	+	+
Glycine	+	+	+	+	+	
Histidine	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+				+
Leucine	+	+				
Lysine	+	+				+
Méthionine	+					
Phénylalanine	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+
Sérine	+	+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+	
Tryptophane	+	+	+	+	+	+
Tyrosine	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+

Composition en acides aminés des différents milieux ayant permis une culture positive des germes.

Numéros des milieux	9	10	11	12	13
Nombre d'acides aminés	Pl.putrif. 9	Cl.sporo. 7	Pl.putrif. 7	Pl.putrif. 7	Pl.putrif. 6
Alanine	+				
Arginine	+	+	+	+	+
Acide aspartique					
Cystéine			+		
Acide glutamique	+	+	+	+	+
Glycine	+				
Histidine	+				
Isoleucine		+			
Leucine					
Lysine		+			
Méthionine				+	
Phénylalanine		+			
Proline	+		+	+	+
Sérine	+		+	+	+
Thréonine					
Tryptophane					
Tyrosine	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+

Pour Clostridium sporogenes, le milieu minimum comprend de plus, l'isoleucine, la lysine et la phénylalanine, tandis que celui de Plectridium putrificum contient la proline et la sérine. Trois de ces acides aminés : phénylalanine, proline et sérine se retrouvent dans le milieu minimum nº5 de Welchia perfringens.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau XV où pour chaque germe, sont consignés le volume total en cm^3, dans les conditions normales de température et de pression (0ºC., 760mm Hg) et la composition centésimale des gaz dégagés dans chaque milieu correspondant.

Les germes ont toujours été ensemencés dans un Erlenmeyer contenant 50cm^3 de milieu et dans lequel un vide correspondant à une pression résiduelle d'environ 15mm de mercure a été effectué, ceci afin de travailler dans les mêmes conditions opératoires. Mais s'il est normal de pouvoir établir une comparaison valable pour différents germes cultivés dans un même milieu, il devient malaisé de le faire quand les germes sont cultivés dans des milieux différents. Nous allons cependant tenter de tirer quelques conclusions à l'issue de la lecture du tableau XV .

Tous les germes furent ensemencés dans le milieu nº1. On peut constater que :

1- Les volumes totaux furent toujours importants et supérieurs à 100cm^3, Welchia perfringens se montrant le plus gazogène, les volumes obtenus par Clostridium septicum, Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum étant sensiblement les mêmes.

2- Les pourcentages en volume d'anhydride carbonique et d'hydrogène sont pratiquement identiques dans les cas de Welchia perfringens et de Clostridium septicum, montrant un rapport CO_2/H_2 égal à 1, tandis qu'ils sont très différents dans

TABLEAU XV - Total des résultats

Numéros des milieux	1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	13
Welchia perfringens											
Volume total en cm^3	148	159		107							
CO_2	49,5	55		47							
H_2	49,8	44,9		52,8							
N_2	0,7	0,1		0,2							
Clostridium septicum											
Volume total en cm^3	124										
CO_2	49,4										
H_2	49,9										
N_2	0,7										
Clostridium sporogenes											
Volume total en cm^3	125	151				160		115			
H_2S	4,8										
CO_2	82,4	79,9				66,8		58,7			
H_2	7,5	19,3				32,8		40,9			
Thiols	4,5	traces				traces		traces			
N_2	0,8	0,8				0,4		0,4			
Plectridium putrificum											
Volume total en cm^3	126		90		114		80		93	52	53
H_2S	5,9		5						3,7		
CO_2	78,5		60		59,4		57,4		59,1	66,4	43,8
H_2	13,2		33,3		39,6		40,5		36,3	28,9	54,9
Thiols	traces		0,7							très faibles traces	
N_2	2,4		1		1		2,1		0,9	4,7	1,3

les cas de Clostridium sporogenes et de Plectridium putrificum montrant un rapport CO_2/H_2 très supérieur à 1. (résultats identiques à ceux déjà trouvés dans le cas du milieu au thioglycolate de sodium) (LABARRE,51,50).

3- Seuls Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum donnent lieu à un dégagement d'hydrogène sulfuré et de thiols, ces derniers en quantité importante dans le cas de Clostridium sporogenes.

Pour le milieu nº2, on peut constater une légère augmentation du volume total gazeux dégagé par Welchia perfringens et Clostridium sporogenes, une augmentation d'anhydride carbonique et une diminution d'hydrogène pour Welchia perfringens, alors que l'inverse existe pour Clostridium sporogenes, qui, en outre, par suite de l'élimination de cystéine et de méthionine ne produit plus d'hydrogène sulfuré.

D'une manière générale, ces 4 germes se montrent très gazogènes, le volume total étant supérieur à 100cm^3, sauf Plectridium putrificum dans certains milieux (nº 4,9,11,12 et 13).

La production d'hydrogène sulfuré semble bien dépendre de la présence des acides aminés soufrés : cystéine et méthionine du milieu nº1, pour Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum, et de la cystéine du milieu nº11 pour Plectridium putrificum. Quant à celle des thiols, elle est révélée par Clostridium sporogenes en quantité importante dans le milieu nº1. Elle se retrouve à l'état de traces dans différents autres milieux : nº 2, 7 et 10 pour ce germe, et en petite quantité dans le milieu nº 12 pour Plectridium putrificum.

Du point de vue du pourcentage en volume d'anhydride carbonique et d'hydrogène, on constate qu'il existe une diminution d'anhydride carbonique et une augmentation d'hydrogène dans les milieux minimums de chaque germe (Nº 5,10 et 13), par rapport au milieu complet. Cette évolution se produit régulièrement du milieu nº 1 au milieu nº 10 pour Clostridium sporogenes,alors qu'il y a une inversion dans le milieu nº 2 pour Welchia perfringens et dans les milieux nº 11 et nº 12 pour Plectridium putrificum,plus accentuée dans le nº 12 que dans le nº 11.

Le rapport CO_2/H_2 diminue :

- très peu pour Welchia perfringens : de 1 à < 1
- beaucoup pour Clostridium sporogenes : de 11 à > 1
- beaucoup pour Plectridium putrificum : de 6 à < 1

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS

Au lieu de cultiver tous les germes anaérobies telluriques provoquant les gangrènes gazeuses dans un seul et même milieu, nous avons choisi seulement quelques bactéries, et avons tenté leur culture dans des milieux uniquement synthétiques, dont nous avons modifié la composition en acides aminés, en utilisant pour chaque germe des milieux de plus en plus pauvres en acides.

Des sept bactéries choisies au départ, seules quatre d'entre elles ont pu se développer dans des milieux synthétiques : Welchia perfringens, Clostridium septicum, Clostridium sporogenes et Plectridium putrificum.

Les cultures des trois autres (Clostridium oedematiens, Clostridium histolyticum et Clostridium bifermentans) se sont toujours révélées négatives dans le milieu le plus riche.

Chaque essai eut lieu dans un Erlenmeyer muni d'un dispositif spécial, grâce auquel on pouvait effectuer et conserver le vide dans la culture.

Après prélèvement des gaz à la trompe de SPRENGEL, nous avons procédé à leur analyse qualitative et quantitative sur la cuve à mercure, vérifiée et complétée par la spectrométrie de masse.

Nous avons abouti à deux sortes de résultats :

1) La composition en acides aminés de différents milieux synthétiques et l'obtention d'un milieu minimum pour chaque souche étudiée.

2) La composition du dégagement gazeux fourni par chaque souche dans différents milieux.

Nous avons constamment trouvé de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène, mais en des rapports très différents selon la richesse des milieux en acides aminés, le rapport CO_2/H_2 allant dans la plupart des cas en diminuant parallèlement à la quantité de ces acides.

L'hydrogène sulfuré semble nettement être sous la dépendance de la cystéine et de la méthionine; d'autre composés soufrés furent décelés par la spectrométrie de masse.

B I B L I O G R A P H I E

1- BALLENTINE,TUCK,SCHNEIDER et RYAN, J.Am.Chim.Soc.,1944,66,1990.

2- BEIJERINCK W.M., Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfat-reduktion, Cent.Bakt.,II Abt. (Jena), 1895,1,3.

3- BEIJERINCK W.M., Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfat-reduktion, Cent.Bakt.,II Abt. (Jena), 1895,1,49.

4- BEIJERINCK W.M., Ueber Spirillum desulfuricans als Ursache von Sulfat-reduktion, Cent.Bakt.,II Abt. (Jena), 1895,1,104.

5- BEIJERINCK W.M., Schwefelwasserstoffbildung in den Stadtgräben und Aufstellung der Gattung Aerobacter,Cent.Bakt.,II Abt. (Jena) 1900,6,193.

6- BENICHOU L., Etude des gaz produits par les bactéries anaérobies, agents de gangrènes gazeuses, cultivées en milieu au thioglycolate de sodium sous vide après alcalinisation du milieu en fin de culture. Thèse Doct.Etat Pharm.,1973.

7- BEYNON J.H., Mass Spectrometry and its applications to organic chemistry. Elsevier Pub.Cº,Ed. 1960.

8- BIEMANN K., Mass spectrometry. Organic chemistry applications.Mc Graw-Hill, New York,1962.

9- BIENSTOCK B., Uber die Bakterien der Faeces. Z.Klin.Med.,1884,8,1.

10- BIENSTOCK B., Bacillus putrificus, Ann.Inst.Pasteur,1906,20,407.

11- BILLY C., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. V- Clostridium sporogenes, souches marines et souches telluriques. Comparaison de leur pouvoir lipidolytique, Ann.Inst.Pasteur, 1962,103,605.

12- BILLY C., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. VII- Welchia perfringens et Welchia agni, Ann.Inst.Pasteur, 1962,103,464.

13- BILLY C. et PREVOT A.R., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. II- Clostridium corallinum, Ann.Inst.Pasteur,1961, 100,474.

14- BLAWDT F.,BOROWSKI E. et SAULEWIEZ L., Bull.Inst.Med.Gdsank, 1958,9, 127.

15- BOIVIN M., Spectromètres de masse, Chimie analytique, 1949,31,5.

16- BOIVIN M., Spectromètres de masse, Chimie analytique, 1949,31,35.

17- BOIVIN M., Spectromètres de masse, Chimie analytique, 1949,31,61.

18- BOIVIN M., Spectromètres de masse, Chimie analytique, 1949,31,80.

19- BOYD,LOGAN et TYTELL, J.Biol.Chem., 1947,167,879.

20- BOYD,LOGAN et TYTELL, J.Biol.Chem., 1948,174,1013.

21- BOYD et SLONIN, Bact.Proc.,1958,20

22- BROWN J.H., The vaseline tube and syringe method of microgas-analysis of bacterial cultures, J.exp.Med.,1922,35,667.

23- BROWN J.H., Study of anaerobic bacteria, J.Bact.,1925,10,513

24- BULMASH J. et WEAVER R.H.,J.Bact.,1957,74,110.

25- CAMPBELL L.L. et FRANK H.A., J.Bact.,1956,71,267.

26- CHAIGNEAU M., Etat actuel de la spectrométrie de masse. Chimie analytique,1965,47,619.

27- CHAIGNEAU M., BORY J., LE MOAN G. et LABARRE C., Composition des gaz dégagés par Cl.septicum cultivé en milieu au thioglycolate, C.R. Acad.Sci. (Paris),1965, 261,2403.

28- CHASSAIGNAC M.E., Sur l'empoisonnement putride dû à une décomposition instantanée du sang à la suite de lésions traumatiques considérables, C.R.Acad.Sci. (Paris),1853,37,463.

29- CHAUVEAU A. et ARLOING S., Etude expérimentale sur la septicémie gangréneuse, Bull.Acad.Med.,1884,2ème série,13, Séances du 3 juin et du 19 août, 715 et 1129.

30- CORNU A. et MASSOT R., Index de spectres de masse, Presses Universitaires de France, 1966.

31- DESCROZAILLES J., BORY J., CHAIGNEAU M. et LABARRE C., Composition des gaz dégagés par Plectridium putrificum cultivé en différents milieux synthétiques. Laboratoire de Microb.,UER Sc.pharm.et biol. de l'Univ.René Descartes, 4 Av.de l'Observatoire,75006 PARIS. E.R.nº42, Service d'Analyse des Gaz du C.N.R.S., Ann.Pharm.Fr. 1973, sous presse.

32- DUCLAUX E., Sur les odeurs de putréfaction, Ann.Inst.Pasteur, 1896,10,59.

33- FAGUET M., Ann.Inst.Pasteur,1961,100,594.

34- FAGUET M. et GONDOT A., Ann.Inst.Pasteur,1961,101,860.

35- FILDES P. et RICHARDSON G., J.Expert.Path.,1935,16,326.

36- FRAENKEL E., Ueber die Aetiologie der Gasphlegmone (Phlegmone emphysematosa).Cent.Bakt.,1893,13,13.

37- FRANGOPOULOS A. et BILLY C., Recherche sur les odeurs dégagées par les anaérobies. III- Clostridium histolyticum, Ann.Inst.Pasteur, 1961,101,136.

38- FRIEDEMANN T.E. and KMIECIAK T.H., Metabolism of pathogenic Clostridia in complex carbohydrate rich culture media. Proc.Soc. exp.Biol.Med.,1941,47,84

39- FUCHS A.R. et BONDE G.J.,J.Gen.Mic.,1957,16,317.

40- GUERIN H., Traité de manipulation et d'analyse des gaz, Masson et Cie,Paris 1952.

41- GUGGENHEIM M., Les amines biologiques. Edition française de BERTHELOT A., PREVOT A.R. et KARL C., Baillière 1933.

42- HARRIS J.E.G., Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes. VIII- The biochemical comparison of micro-organisms by quantitative methods., J.Path.Bact.,1919,23,30.

43- IZUMI K., J.Bact.,1962,83,956.

44- KAHN M.C., Hydrogen sulphide production by anaerobic spore-bearing bacteria,J.Bact.,1925,10,439.

45- KENDALL A.,DAY A. and WALKER A., Studies in bacterial metabolism, J.Infect.Dis.,1922,30,141.

46- KNIGHT et FILDES P., Brit.J.Expert.Path.,1933,14,112.

47- KONDRATIEVA V.F. et SHVEDOVA U.N., Mikrob.,1961,30,26.

48- KONDRATIEVA V.F. et SHVEDOVA U.N., Mikrob.,1963,32,329.

49- KUNDU K., KAISER P. et BILLY C., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. IV- Les pectinolytiques rouisseurs., Ann.Inst. Pasteur, 1962,102,69.

50- LABARRE C., Etude des gaz produits par les bactéries anaérobies telluriques agents des gangrènes gazeuses cultivées en milieu au thioglycolate de sodium. Thèse Doct.Etat Pharm.,1968.

51- LABARRE C., CHAIGNEAU M., BORY J. et LE MOAN G., Composition des gaz dégagés par Clostridium sporogenes et par Clostridium septicum cultivés en milieu au thioglycolate. C.R.Acad.Sci. (Paris),1966. 262,2550.

52- LAIGRET J., Fermentation méthanique due au Bacille perfringens; rôle catalyseur de l'iode au cours de cette fermentation. C.R.Acad. Sci.(Paris),1945,221,359.

53- LAMBIN S. et GERMAN A., Précis de Microbiologie, 2è édit. Masson et Cie, Paris 1969.

54- LE MOAN G., LABARRE C., CHAIGNEAU M. et BORY J., Composition des gaz dégagés par Clostridium histolyticum cultivé en milieu au thioglycolate, C.R.Acad.Sci.(Paris), 1966,263,1906.

55- LE MOAN G., VALDENER G. et CHAIGNEAU M., Spectrométrie de masse de haute résolution : principes, appareils, applications. Chimie et industrie, 1966,95,162.

56- MAISONNEUVE, De la gangrène foudroyante avec développement et circulation de gaz putrides dans les veines (Pneumohémie putride), C.R.Acad.Sci. (Paris),1853,37,425.

57- Mc CLUNG L.S. and Mc COY E., Studies on anaerobic bacteria, J.Bact. 1934,28,267.

58- Mc DOWAL C.A., Mass spectrometry, Mc Graw-Hill,New York et Londres, 1963.

59- Mc LAFFERTY F.W., Mass spectrometry of organic ions. Academic Press New York et Londres,1963.

60- METCHNIKOFF E., Etude sur la flore intestinale, Ann.Inst.Pasteur, 1908,22,929.

61- MURAZ P.J.M., Sur les fermentations microbiennes dans les plaies de guerre, Thèse Doct.Univ.Pharm.,Paris 1920.

62- MYERS J.T., The production of hydrogen sulphide by bacteria, J.Bact. 1920,5,231.

63- NENCKI M. und SIEBER N., Uber die Bildung der Paramilchsaüre durch Gärung des Zuckers.Sitzungsber.der Kais.Akad.der Wiss.in Wien. Math-naturw.Klasse, 1889,98.

64- PASTEUR L., Animalcules infusoires vivant sans gaz oxygène libre et déterminant des fermentations,C.R.Acad.Sci.Paris, 1861,52,344.

65- PASTEUR L., Vibrion septique et septicémie, Bull.Acad.Med.,1881, 2ème série,10,176.

66- PASTEUR L. et JOUBERT, Charbon et septicémie, Bull.Acad.Méd., 1877,2ème série,6,781.

67- PERKINS et TSUJI, J.Bact.,1962,84,86.

68- PERSKY S. et BILLY C., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. VI- Asporulales, Ann.Inst.Pasteur,1962,103,461.

69- PREVOT A.R., Etudes de systématique bactérienne. IV- Critique de la conception actuelle du genre Clostridium, Ann.Inst.Pasteur, 1938,61,72.

70- PREVOT A.R., Manuel de classification des Anaérobies, Masson et Cie, Paris,1940.

71- PREVOT A.R., Recherches sur la flore anaérobie des boues méthanogènes naturelles,C.R.Acad.Sci. (Paris),1946,222,296.

72- PREVOT A.R., Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies, 2ème édition,Masson et Cie,1948.

73- PREVOT A.R., Biologie des maladies dues aux Anaérobies. Editions médicales Flammarion,Paris,1955.

74- PREVOT A.R., Manuel de détermination des Anaérobies, 3ème édition, Masson et Cie,1957.

75- PREVOT A.R., Traité de systématique bactérienne, Dunod,Paris,1961.

76- PREVOT A.R. et LAPLANCHE J., Influence des nitrates sur la production de gaz par Welchia perfringens, Ann.Inst.Pasteur,1947,73,836

77- PREVOT A.R., RAYNAUD M.et DIGEON M., Production de méthane par Clostridium bifermentans et Clostridium caproicum,C.R.Soc.Biol. 1946,140,235.

78- PREVOT A.R. et SARRAF A., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies. I- Inflabilis lacustris,Ann.Inst.Pasteur,1960,99,629.

79- PREVOT A.R. et THOUVENOT H., Recherches sur les odeurs dégagées par les anaérobies . VIII- Clostridium botulinum et Clostridium sordellii , Ann.Inst.Pasteur,1962,103,925.

80- PREVOT A.R.,TURPIN A. et KAYSER P., Les microbes anaérobies, Dunod, Paris,1967.

81- REED R.I., Mass spectrometry,Academic Press,New York et Londres,1965.

82- REGNIER J., De l'évolution microbienne dans les premières heures de la plaie de guerre. Thèse Doct.Univ.Pharm.,Paris,1922.

83- RENAULT, Gangrène traumatique. Mémoire et observations cliniques sur une de ses causes les plus fréquentes dans les animaux domestiques,1840,in WEINBERG M. et SEGUIN P., La gangrène gazeuse. Masson et Cie, Paris, 1918.

84- RUBNER, Vergleich des Wärmestrahlungsvermögens trockener Kleidungsstoffe,Arch.Hyg.,1892,16,105.

85- RUNOVA V.F., J.Mik.Epid.Imm.,1962,3,62.

86- RYAN,BALLENTINE,STOLONG,CORSON,SCHNEIDER,J.Am.Chem.Soc.,1945,67,129.

87- RYAN,SCHNEIDER et BALLENTINE, Proc.Nat.Acad.Sci.,1946,32,10.

88- SALUS G., Zur Biologie der Faülniss.Arch.Hyg.Bakt.,1904,51,118.

89- SARRAF A., Recherches sur les amines de décarboxylation produites par une bactérie anaérobie : Inflabilis lacustris, Thèse Doct. Univ.Pharm.,Paris 1960.

90- SELITRENN L., Uber die Zersetzung des Leims durch anaërobe Spaltpilze Monatsh.Chem.,1889,10,908.

91- SHANGAR et BARD,Bact.Proc.,1951,142.

92- SHANGAR et BARD,J.Bact.,1955,69,436.

93- SHULL G.M.,THOMA R.W. et PETERSON W.H., Arch.Bioch.,1949,20,227.

94- SMITH et DOUGLAS,J.Bact.,1950,60,9.

95- SORDELLI A., Un anaérobie agent de gangrène gazeuse,C.R.Soc.Biol., 1922,87,838.

96- THOMA R.W. et PETERSON W.H., J.Bact.,1950,60,39.

97- THOMPSON L.S., The group of hydrogen sulphide producing bacteria, J.Med.Res.,1921,42,383.

98- TILLEY F.W., Variations in hydrogen sulphide production by bacteria, J.Bact.,1923,8,115.

99- TILLEY F.W., The relation between chemical composition of peptones and hydrogen sulphide production by bacteria,J.Bact.,1923,8,287.

100- TISSIER H., Recherches sur la flore bactérienne des plaies de guerre, Ann.Inst.Pasteur,1916,30,681.

101- TISSIER H., Recherches sur la flore bactérienne des plaies de guerre, Ann.Inst.Pasteur,1917,31,161.

102- TISSIER H. et MARTELLY, Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie, Ann.Inst.Pasteur,1902,16,865.

103- VEILLON et ZUBER, Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie, Arch.Med.exp.,1898,10,517.

104- WEBB, J. Gen.Microb.,1948,2,275.

105- WEBB, J.Soc.Chem.Ind.,1949,68,319.

106- WEINBERG M.,NATIVELLE R. et PREVOT A.R., Les microbes anaérobies, Masson et Cie, Paris,1937.

107- WEINBERG M. et SEGUIN P., Le Bacillus oedematiens et la gangrène gazeuse,C.R.Soc.Biol.,1915,78,507.

108- WEINBERG M. et SEGUIN P., Flore microbienne de la gangrène gazeuse, C.R.Soc.Biol.,1915,161,744.

109- WEINBERG M. et SEGUIN P., Contribution à l'étiologie de la gangrène gazeuse,C.R.Acad.Sci. (Paris),1916,163,449.

110- WEINBERG M. et SEGUIN P., Démonstration des lésions provoquées chez le cobaye par le Bacillus histolyticus Toxine de ce microbe. C.R.Soc.Biol.,1917,80,157.

111- WEINBERG M. et SEGUIN P., La gangrène gazeuse,Masson et Cie,Paris 1918

112- WELCH W.H. and NUTTAL G.H.F., A gas producing bacillus (Bacillus aerogenes capsulatus,nov.spec.) capable of rapid development in the blood vessels after death, Bull.of the John's Hopkins Hospital, 1892,3,81.

113- WICKLEIN E., Drei Fälle von Gasgangrän,Virchows Arch.,1891,125,75.

114- WILMET M., Contribution à l'étude et à l'analyse des mélanges gazeux. Thèse Doct.Sci.,Paris 1929.

115- WOLF C.G.L.,Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes. V- The biochemistry of Vibrion septique ,J.Path.Bact.,1918,22,115

116- WOLF C.G.L., The proteolytic action of Bacillus sprorogenes and Bacillus welchii,J.Path.Bact.,1918,22,270.

117- WOLF C.G.L., Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes IX- The biochemistry of Bacillus oedematiens, J.Path.Bact.,1919, 23,254.

118- WOLF C.G.L. and HARRIS J.E.G., Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes. I- The biochemistry of Bacillus welchii and Bacillus sporogenes,J.Path.Bact.,1917,21,386.

119- WOLF C.G.L. and HARRIS J.E.G., Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes. III- The effect of acid on the growth of Bacillus welchii and Bacillus sporogenes, Biochem.J., 1917,11,213.

120- WOLF C.G.L. and HARRIS J.E.G., Contributions to the biochemistry of pathogenic anaerobes. IV- The biochemistry of Bacillus histolyticus J.Path.Bact.,1918,22,1.

121- WOLF C.G.L. and TELFER S., Contributions to the pathogenic anaerobes. II- The acid production of Bacillus welchii (Bacillus perfringens) and Bacillus sporogenes,Biochem.J.,1917,11,197.

T A B L E des M A T I E R E S

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - Historique 3

CHAPITRE II - Milieux de culture 7

CHAPITRE III - Protocole expérimental 19

CHAPITRE IV - Résultats 30

Welchia perfringens 31

Clostridium septicum 38

Clostridium oedematiens 42

Clostridium histolyticum 44

Clostridium sporogenes 46

Clostridium bifermentans 52

Plectridium putrificum 54

CHAPITRE V - Discussion des résultats 59

CHAPITRE VI - Conclusions 65

BIBLIOGRAPHIE 67